



TESIS - SK142502

**METABOLIT SEKUNDER, ANTIDIABETES,
ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI DARI *SYZYGIUM
POLYANTHUM* WIGHT**

**NURINA RIZKA RAMADHANIA
NRP. 01211650010020**

**DOSEN PEMBIMBING
SRI FATMAWATI, M.Sc., Ph.D
ADI SETYO PURNOMO, M.Sc., Ph.D**

**PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHLIAN KIMIA ORGANIK
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018**



THESIS - SK142502

**SECONDARY METABOLITES, ANTIDIABETIC,
ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL FROM
SYZYGium POLYANTHUM WIGHT**

NURINA RIZKA RAMADHANIA
NRP. 01211650010020

SUPERVISOR
SRI FATMAWATI, M.Sc., Ph.D
ADI SETYO PURNOMO, M.Sc., Ph.D

MAGISTER PROGRAM
ORGANIC CHEMISTRY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018

HALAMAN PENGESAHAN TESIS

Telah disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si.)
di

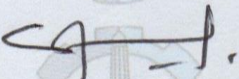
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

Nurina Rizka Ramadhania
NRP. 01211650010020

Tanggal Ujian : 3 Agustus 2018
Periode Wisuda : September 2018


Disetujui oleh :


1. Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D.
NIP. 19801103 200212 2 001

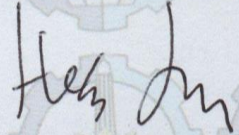
(Pembimbing I)


2. Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.
NIP. 19800724 200812 1 002


(Pembimbing II)


3. Prof. Mardi Santoso, Ph.D.
NIP. 19650131 198910 1 001

(Penguji)

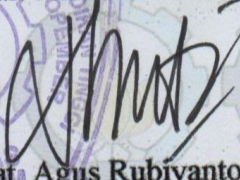

4. Dr. Hendro Juwono, M.Si.
NIP. 19610606 198803 1 001

(Penguji)


5. Suprpto, M.Si., Ph.D.
NIP. 19720919 199802 1 001

(Penguji)

Dekan Fakultas Ilmu Alam


Prof. Dr. rer. nat. Agus Rubiyanto, M.Eng.Sc.
NIP. 19650619 198903 1 001

METABOLIT SEKUNDER, ANTIDIABETES, ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI DARI *SYZYGIUM POLYANTHUM* WIGHT

Nama : Nurina Rizka Ramadhania
NRP : 01211650010020
Departemen : Kimia ITS
Pembimbing : Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D
Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D

Abstrak

Pada penelitian ini telah dilakukan penentuan bioaktivitas dari ekstrak metanol dan fraksi-fraksi dari daun *S. polyanthum* Wight sebagai antioksidan, antidiabetes dan antibakteri. Antioksidan diuji dengan mengukur penghambatan radikal bebas DPPH dan ABTS. Antidiabetes diuji dengan mengukur penghambatan enzim α -glukosidase dan aldosa reduktase. Antibakteri diuji dengan mengukur penghambatan terhadap 4 bakteri patogen (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*). Berdasarkan hasil bioaktivitas ekstrak metanol dan fraksi-fraksi tersebut, telah dilakukan isolasi senyawa dengan metode pemisahan dan pemurnian, serta identifikasi struktur senyawa menggunakan analisa ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HMBC dan HMQC. Hasil isolasi senyawa dari fraksi etil asetat didapatkan senyawa E5.C3 yang merupakan senyawa etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat. Ekstrak metanol, fraksi-fraksi dan senyawa metabolit dalam daun *S. polyanthum* Wight tersebut dapat berpotensi sebagai alternatif pengobatan untuk meningkatkan kesehatan masyarakat.

Kata kunci: *S. polyanthum* Wight, Antioksidan, Antidiabetes, Antibakteri.

**SECONDARY METABOLITES, ANTIDIABETIC,
ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL FROM *SYZYGium*
POLYANTHUM WIGHT**

Name : Nurina Rizka Ramadhania
NRP : 01211650010020
Department : Chemistry ITS
Supervisor : Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D
Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D

Abstract

In this research, bioactivities of methanol extract and its fractions of *S. polyanthum* Wight leaves as antioxidant, antidiabetes and antibacterial have been determined. Antioxidants were tested by measuring the inhibition of DPPH and ABTS free radical. Antidiabetes was tested by measuring the inhibition of α -glucosidase and aldose reductase enzymes. Antibacterials were tested by measuring inhibition of 4 pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*). Based on the result of bioactivities of methanol extract and its fractions, further isolation of compounds by separation and purification method, and identification of structure of compound using analysis of ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HMBC and HMQC. The result of isolation of the compound from ethyl acetate fraction was found E5.C3 compound which is ethyl 4-hydroxy-3(3'-metyl-2'-butenyl)benzoate compound. The methanol extracts, fractions and metabolite compounds in the *S. polyanthum* Wight leaves can potentially serve as an alternative treatment of plant extracts to improve public health.

Keywords: *S. Polyanthum* Wight, Antioxidant, Antidiabetes, Antibacterial.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas curahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyusun TESIS yang berjudul **“Metabolit Sekunder, Antidiabetes, Antioksidan dan Antibakteri dari *Syzygium polyanthum* Wight”**.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan dalam penyusunan TESIS ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Sri Fatmawati, M.Sc, Ph.D dan Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing atas semua bimbingan, masukan, arahan dan nasehat yang berharga dalam penyusunan Pra Tesis ini, serta semua motivasi yang telah diberikan untuk selalu maju meraih mimpi dan cita-cita saya.
2. Prof. Mardi Santoso, Ph.D, selaku Kaprodi Magister Kimia ITS
3. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc, selaku Ketua Jurusan Kimia ITS
4. Prof. Dr. R. Y. Perry Burhan, M.Sc, selaku dosen wali atas semua arahan dalam pengambilan mata kuliah Pra Tesis.
5. Kedua orang tua tercinta atas dukungan serta do'a yang tiada henti. Ayah dan Ibu adalah alasan terbesarku untuk selalu berjuang mewujudkan mimpi.
6. Kakak tersayang dan keluarga besar yang selalu memberikan semangat, dukungan dan do'a.
7. Keluarga besar Kimia ITS Program Magister/S2 angkatan 2016, teman-teman Program Sarjana/S1 angkatan 2012 “SPECTRA”, keluarga Laboratorium NPSC dan sahabat saya Novia, Indri, Ain dan Omita yang selalu memberikan dukungan selama studi dan penelitian.
8. Semua pihak yang telah membantu yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam TESIS ini masih terdapat kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga TESIS ini dapat memberi manfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, 30 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI	
2.1 Daun <i>Syzygium polyanthum</i> Wight.....	7
2.2 Kandungan Senyawa pada Daun <i>S. polyanthum</i> Wight.....	8
2.3 Metode Pemisahan dan Pemurnian.....	14
2.3.1 Ekstraksi.....	15
2.3.2 Kromatografi.....	15
2.4 Metode Penentuan Struktur Senyawa.....	17
2.4.1 Spektroskopi ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR.....	17
2.4.2 Spektroskopi HMBC dan HMQC.....	19
2.5 Aktivitas Antidiabetes.....	19
2.5.1 Penghambatan Enzim α -Glukosidase.....	20
2.5.2 Penghambatan Enzim Aldosa Reduktase.....	22
2.6 Aktivitas Antioksidan.....	23

2.6.1	Penghambatan DPPH.....	24
2.6.2	Penghambatan ABTS.....	24
2.7	Aktivitas Antibakteri.....	26

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1	Alat dan Bahan.....	29
3.1.1	Alat.....	29
3.1.2	Bahan.....	29
3.2	Prosedur Isolasi Senyawa dari Daun <i>S. polyanthum</i> Wight.....	30
3.2.1	Ekstraksi Daun <i>S. polyanthum</i> Wight	30
3.2.2	Isolasi Senyawa dari Daun <i>S. polyanthum</i> Wight.....	30
3.3	Prosedur Uji Bioaktivitas	31
3.3.1	Aktivitas Inhibitor α -Glukosidase.....	31
3.3.2	Aktivitas Inhibitor Aldose Reduktase.....	31
3.3.3	Aktivitas Antioksidan DPPH.....	32
3.3.4	Aktivitas Antioksidan ABTS.....	32
3.3.5	Aktivitas Antibakteri.....	33

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Ekstraksi Daun <i>S. polyanthum</i> Wight	35
4.2	Isolasi Senyawa dari Daun <i>S. polyanthum</i> Wight.....	36
4.3	Identifikasi Senyawa dari Daun <i>S. polyanthum</i> Wight.....	40
4.4	Uji Bioaktivitas	46
4.4.1	Aktivitas Inhibitor α -Glukosidase.....	46
4.4.2	Aktivitas Inhibitor Aldose Reduktase.....	47
4.4.3	Aktivitas Antioksidan DPPH.....	48
4.4.4	Aktivitas Antioksidan ABTS.....	49
4.4.5	Aktivitas Antibakteri.....	50

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan	55
5.2	Saran	55

DAFTAR PUSTAKA.....	57
----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	67
----------------------	-----------

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Daun <i>S. polyanthum</i> Wight	7
Gambar 2.2 Pergeseran kimia ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR	18
Gambar 2.3 Mekanisme pencernaan karbohidrat (a) dan penghambatan α-glukosidase (b)	21
Gambar 2.4 Mekanisme penghambatan radikal DPPH	24
Gambar 2.5 Mekanisme penghambatan radikal ABTS	25
Gambar 4.1 Pemisahan dan Penggabungan Fraksi Etil Asetat (Fraksi E) dengan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (1 : 9)	37
Gambar 4.2 Pemisahan dan Penggabungan Fraksi E5 dengan eluen diklorometana : etil asetat (3 : 7)	38
Gambar 4.3 Pemisahan dan Penggabungan Fraksi E5.C dengan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (1 : 4)	39
Gambar 4.4 Hasil KLT 3 eluen Senyawa 1 (Fraksi E5.C3)	41
Gambar 4.5 Hasil KLT 2 dimensi Senyawa 1 (Fraksi E5.C3)	41
Gambar 4.6 Korelasi HMBC senyawa E5.C3	44
Gambar 4.7 Struktur senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'- butenil)benzoat)	45
Gambar 4.8 Penghambatan enzim α-glukosidase pada daun <i>S.</i> <i>polyanthum</i> Wight pada konsentrasi 333 µg/mL	47
Gambar 4.9 Penghambatan enzim aldosa reduktase pada daun <i>S.</i> <i>polyanthum</i> Wight pada konsentrasi 100 µg/mL	48
Gambar 4.10 Penghambatan DPPH pada daun <i>S. polyanthum</i> Wight pada konsentrasi 159,73 µg/mL	49
Gambar 4.11 Penghambatan ABTS pada daun <i>S. polyanthum</i> Wight pada konsentrasi 49,5 µg/mL	50
Gambar 4.12 Penghambatan bakteri (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> dan <i>B. subtilis</i>) pada daun <i>S. polyanthum</i> Wight pada konsentrasi 100 µg/mL	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Nilai IC ₅₀ aktivitas antioksidan dari ekstrak <i>S. polyanthum</i> Wight	12
Tabel 4.1 Pemisahan dan Penggabungan Fraksi Etil Asetat (Fraksi E)	37
Tabel 4.2 Pemisahan dan Penggabungan Fraksi E5	39
Tabel 4.3 Pemisahan dan Penggabungan Fraksi E5.C	40
Tabel 4.4 Data pergeseran kimia ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR senyawa E5.C3 (pelarut kloroform, 400 MHz)	42
Tabel 4.5 Data korelasi HMQC dan HMBC senyawa E5.C3	43
Tabel 4.6 Nilai IC ₅₀ aktivitas antibakteri pada daun <i>S. polyanthum</i> Wight terhadap bakteri <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i>	52

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
LAMPIRAN A : SKEMA KERJA	67
1. Ekstraksi Daun <i>S. polyanthum</i> Wight	67
2. Isolasi Senyawa dari Daun <i>S. polyanthum</i> Wight	68
3. Uji Bioaktivitas Senyawa dari Daun <i>S. polyanthum</i> Wight	69
 LAMPIRAN B : SPEKTRA NMR	 72
1. Spektra ¹ H-NMR senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat)	72
2. Spektra ¹³ C-NMR senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat)	72
3. Spektra HMQC senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat)	73
4. Spektra HMBC senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat)	74
 LAMPIRAN C : PERHITUNGAN NILAI IC₅₀	 75

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kesehatan masyarakat menjadi salah satu permasalahan utama bagi masyarakat Indonesia. Salah satu penyakit yang memiliki efek dalam jangka panjang adalah diabetes melitus merupakan penyakit yang disebabkan karena tingginya kadar gula darah sehingga metabolisme tubuh terganggu dan menyebabkan adanya kerusakan sel dan jaringan tubuh. Kerusakan sel dan jaringan tubuh juga menyebabkan sistem imun atau kekebalan tubuh mengalami penurunan. Pada kondisi tubuh tersebut, mikroorganisme seperti bakteri-bakteri yang berasal dari lingkungan akan mudah masuk ke dalam tubuh. Bakteri-bakteri tersebut akan mudah berkembangbiak dalam tubuh dan menimbulkan berbagai infeksi dan penyakit. Hal tersebut merupakan dampak dari komplikasi diabetes jika tidak segera dilakukan penanganan dan dapat berakibat kematian.

Negara-negara yang memiliki mayoritas populasi penderita diabetes antara lain negara China, India, Amerika Serikat dan Indonesia (Ramachandran dkk., 2010). Data statistik dari Badan Kesehatan Dunia (WHO) menyatakan bahwa penyakit diabetes melitus telah menjangkit sebanyak 422 juta orang di dunia pada tahun 2014 dan akan meningkat berkali-kali lipat jumlahnya pada tahun 2035. Jumlah penderita tersebut akan mengalami kenaikan yang drastis pada negara-negara berkembang. Jumlah penderita diabetes di Indonesia mengalami kenaikan sebesar 9,1 juta pada tahun 2015 menjadi sekitar 21,3 juta pada tahun 2030 (WHO, 2016). Angka kematian akibat penyakit ini sebelum usia 70 dapat mencapai 1,5 juta pada tahun 2012 dan 90% adalah penderita diabetes melitus tipe 2 dari keseluruhan populasi penderita diabetes. Penyakit ini dikenal sebagai *silent killer* karena sering tidak disadari oleh penderitanya, namun baru diketahui setelah terjadi komplikasi seperti serangan jantung, stroke, gagal ginjal, kehilangan penglihatan dan kerusakan syaraf (Kemenkes RI, 2014).

Penderita diabetes melitus yang mengalami kenaikan konsentrasi glukosa dalam darah dan melebihi kadar normal disebut dengan kondisi hiperglikemia. Penderita diabetes melitus terbagi menjadi diabetes melitus tipe 1 dan tipe 2. Diabetes melitus tipe 1 merupakan hiperglikemia yang bergantung pada insulin dan dipengaruhi oleh faktor gen karena sel β -pankreas yang rusak. Sedangkan, diabetes melitus tipe 2 merupakan hiperglikemia yang tidak bergantung pada insulin atau resistensi insulin dan dipengaruhi oleh faktor usia, gaya hidup, serta obesitas (WHO, 2016). Tujuan pengobatan farmakoterapi untuk diabetes melitus adalah mengembalikan kadar glukosa darah menjadi normal pada penderita diabetes. Terapi obat hipoglikemik oral pada penderita diabetes melitus telah banyak digunakan namun memiliki efek samping bagi tubuh seperti hipoglikemia, berat badan naik, kembung, mual, diare, dan sebagainya.

Saat ini mulai dikembangkan obat diabetes yang memiliki mekanisme kerja sebagai inhibitor katabolisme karbohidrat, melalui penghambatan kerja enzim α -glukosidase (Berna dkk., 2015) dan aldosa reduktase yang dapat mengurangi kadar glukosa darah (Widowati, 2008). Enzim α -glukosidase (maltase, isomaltase, glukomaltase dan sukrase) adalah enzim yang bertanggung jawab terhadap penguraian karbohidrat menjadi glukosa pada dinding halus usus menjadi gula yang lebih sederhana, yang kemudian diserap ke dalam tubuh dan dapat meningkatkan kadar gula darah. Enzim aldosa reduktase merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis reduksi glukosa menjadi sorbitol dalam ginjal. Hal ini akan mengganggu osmoregulasi sel yang mengakibatkan kerusakan sel dan terjadi komplikasi diabetes (Logendra dkk., 2006). Namun penggunaan inhibitor α -glukosidase dan aldosa reduktase juga memiliki efek samping seperti kembung, mual, diare dan flatulensi. Obat antidiabetes alami yang berasal dari senyawa hasil isolasi tanaman dapat dijadikan sebagai alternatif pendekatan terapi dalam pengobatan hiperglikemia karena memiliki efek samping yang rendah.

Penderita diabetes melitus tipe 2 juga disebabkan oleh peningkatan pembentukan Spesies Oksigen Reaktif (*Reactive Oxygen Species* / ROS) di dalam mitokondria yang akan menimbulkan stres oksidatif dan kerusakan sel-sel dalam

tubuh yaitu termasuk sel β -pankreas yang merupakan sel penghasil insulin. Sebagai alternatif, saat ini banyak dikembangkan senyawa antioksidan yang berasal dari tanaman. Senyawa aktif tanaman dapat bertindak sebagai antioksidan yaitu agen protektif yang menginaktivasi dan menghalangi ROS masuk dalam tubuh, sehingga dapat mengurangi terjadinya kerusakan sel β -pankreas. Kandungan senyawa polifenol aktif tanaman dapat bertindak sebagai antioksidan dan aktivitas hipoglikemia (Widowati, 2008). Antioksidan dapat menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan elektron untuk mencapai kondisi stabil. Mengukur kemampuan senyawa aktif antioksidan dapat dilakukan dengan melakukan uji aktivitas antioksidan seperti penghambatan DPPH (*2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl-hydrate*) dan ABTS (*2,2'-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)*).

Indonesia telah dikenal sebagai negara yang memiliki keanekaragaman hayati dan berpotensi dalam pengembangan obat herbal yang berbasis pada tanaman asli daerah tropis. Tanaman merupakan salah satu sumber daya alam yang sangat penting dalam upaya pengobatan dan meningkatkan kesehatan masyarakat. Sumber utama sintesis obat adalah menggunakan senyawa berpotensi yang diambil dari tanaman atau isolasi tanaman. Menurut WHO (2016), secara global sejak tahun 2005 sebanyak 25% senyawa hasil isolasi tanaman digunakan sebagai obat dan lebih dari 80% masyarakat bergantung pada penggunaan obat tersebut. Di Indonesia, terdapat sekitar 70.000 spesies tanaman diantaranya 7.000 spesies tanaman obat yang memiliki potensi sebagai obat. Jumlah tanaman obat yang dimanfaatkan oleh masyarakat yaitu sekitar 1.000 sampai 1.200 spesies dan digunakan oleh industri obat tradisional sekitar 300 spesies (Drianti, 2012).

Senyawa hasil isolasi tanaman baik senyawa murni atau ekstrak tanaman standar dapat dikembangkan menjadi obat baru yang sesuai dengan kebutuhan masyarakat. Metabolit sekunder yang penting dalam kandungan tanaman digunakan sebagai obat dengan tujuan terapeutik (WHO, 1979), antara lain alkaloid, flavonoid, tanin dan senyawa fenolat (Hassan dkk., 2009). Beberapa metode saat ini yang tersedia untuk mengetahui aktivitas biologis dari senyawa

bahan alam selain antidiabetes dan antioksidan adalah aktivitas antibakteri. Antibakteri adalah senyawa yang dapat menghambat dan mengendalikan pertumbuhan dan metabolisme bakteri yang bersifat merugikan (Pelczar dan Chan, 1988). Pengendalian pertumbuhan bakteri bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, serta mencegah pembusukan dan kerusakan bahan oleh bakteri (Sulistyo, 1971).

Dalam perkembangan obat di bidang medis, tanaman asli Indonesia yang dapat dimanfaatkan sebagai ramuan obat tradisional adalah *Syzygium polyanthum* Wight atau yang dikenal dengan nama daun salam. Daun *S. polyanthum* Wight dipercaya memiliki khasiat yang dapat digunakan sebagai obat untuk terapi hipertensi, diabetes melitus, asam urat, diare, maag, sakit gigi dan infeksi luka akibat bakteri (Sudirman, 2014). *S. polyanthum* Wight mengandung senyawa metabolit sekunder dan menimbulkan efek sinergisme antar senyawa sehingga memiliki banyak aktivitas farmakologi. Kandungan senyawa metabolit sekunder tanaman memiliki *polivalent activity*, sehingga memungkinkan dapat mengatasi berbagai penyakit.

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa ekstrak *S. polyanthum* Wight sangat berpotensi dijadikan antidiabetes sebagai terapi baru untuk diabetes melitus (Sri dan I Wayan, 2017). Hal ini dibuktikan dengan pengobatan penderita diabetes dengan *S. polyanthum* Wight sebagai obat tradisional telah digunakan di Puskesmas Sering, Medan, Indonesia (Widyawati dkk., 2015). Tinjauan fitokimia dari ekstrak metanol daun *S. polyanthum* Wight menunjukkan adanya kandungan senyawa saponin, tanin, alkaloid, triterpenoid, flavonoid, karbohidrat (Hidayati dkk., 2017), polifenol (Lelono dkk., 2009), dan minyak atsiri (Noveriza dan Miftakhurohmah, 2010) sehingga juga berpotensi sebagai agen antioksidan dan antibakteri (Sudirman, 2014). Kombinasi tersebut dapat menawarkan perspektif baru dalam pengobatan antidiabetes secara efisien sehingga tidak hanya mengendalikan hiperglikemia tetapi juga secara efektif mencegah perkembangan komplikasi diabetes. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa-senyawa dari *S. polyanthum*

Wight tersebut dari ekstrak dan fraksi-fraksi yang memiliki aktivitas biologis sebagai antidiabetes, antioksidan dan antibakteri. Hal ini dilakukan berdasarkan hasil uji fitokimia dari berbagai ekstrak dan fraksi-fraksi *S. polyanthum* Wight pada penelitian sebelumnya.

1.2 Permasalahan

Penggunaan ekstrak tanaman sebagai pengobatan alternatif alami untuk penyakit diabetes melitus dan komplikasinya sangat diperlukan. Salah satunya berasal dari daun *S. polyanthum* Wight. Ekstrak daun *S. polyanthum* Wight sebagai obat herbal telah digunakan di Indonesia, namun belum ada informasi ilmiah mengenai besarnya aktivitas antidiabetes dalam penghambatan enzim aldosa reduktase mengendalikan hiperglikemia dan memiliki efek samping yang rendah. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji aktivitas antidiabetes, antioksidan dan antibakteri ekstrak dan fraksi-fraksi daun *S. polyanthum* Wight serta isolasi dan identifikasi senyawa yang terkandung didalam daun *S. polyanthum* Wight.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada daun *S. polyanthum* Wight.
2. Mengetahui aktivitas antidiabetes, antioksidan dan antibakteri pada ekstrak dan fraksi-fraksi dari daun *S. polyanthum* Wight.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dalam penelitian ini diharapkan dapat membuktikan bahwa ekstrak dan fraksi-fraksi memiliki aktivitas antidiabetes, antioksidan dan antibakteri, serta dapat mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa dari daun *S. polyanthum* Wight. Hasil penelitian tersebut diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah bahwa daun *S. polyanthum* Wight dapat digunakan sebagai terapi herbal alternatif pengobatan diabetes melitus dan komplikasinya.

"Halaman ini sengaja dikosongkan"

BAB 2

KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI

2.1 Daun *Syzygium polyanthum* Wight

Daun *S. polyanthum* Wight atau *Eugenia polyantha* merupakan bagian dari famili Myrtaceae yang terdapat di negara subtropis dan tropis seperti Indonesia, Malaysia, Thailand, Singapura, Myanmar, India, Vietnam, Filipina dan Brunei. Daun *S. polyanthum* Wight merupakan salah satu tanaman obat di Indonesia yang dikenal dengan nama daun salam. Penampakan daun *S. polyanthum* Wight dapat dilihat seperti gambar berikut:



Gambar 2.1 Daun *S. polyanthum* Wight

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Myrtales
Famili	: Myrtaceae
Genus	: Syzygium
Spesies	: <i>Syzygium polyanthum</i> Wight

(Wasito, 2011)

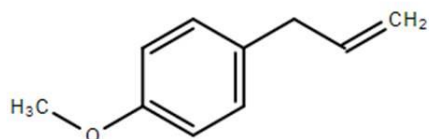
Tanaman *S. polyanthum* Wight tumbuh di dataran rendah ketinggian 5 m hingga di pegunungan 1.800 m diatas permukaan laut. Tanaman ini termasuk

dalam tanaman menahun (tanaman keras) karena dapat mencapai umur hingga bertahun-tahun (Sumono dan Wulan, 2009). Tanaman *S. polyanthum* Wight tumbuh besar dan tinggi hingga mencapai 20-25 meter. Simplisia *S. polyanthum* Wight berwarna kecoklatan, bau aromatik lemah dan rasa kelat. Daun tunggal memanjang 7-15 cm, lebar 5-10 cm, ujung dan pangkal daun meruncing.

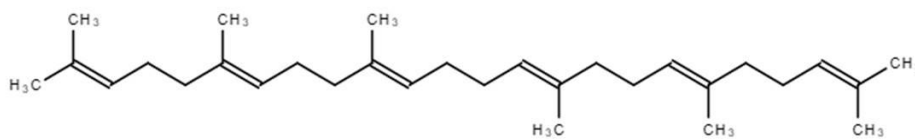
2.2 Kandungan Senyawa pada Daun *S. polyanthum* Wight

Daun *S. polyanthum* Wight telah dikenal sejak lama sebagai tanaman obat tradisional yang sangat potensial di Indonesia dan digunakan sebagai rempah-rempah di berbagai negara di Asia Tenggara. Daun *S. polyanthum* Wight dapat diuji hingga tahap uji klinis untuk mendapatkan obat golongan fitofarmaka (Dewoto, 2007). *S. polyanthum* Wight memiliki berbagai macam aktivitas farmakologis antara lain antihipertensi, antidiare, antiinflamasi, antidiabetes, antioksidan, antijamur, antibakteri (Rizki dan Hariandja, 2015), sehingga dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat oleh masyarakat di daerah subtropis maupun tropis termasuk Indonesia.

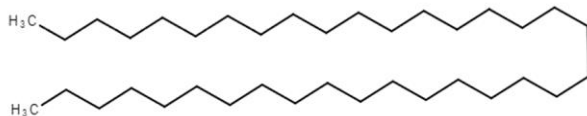
Hasil uji fitokimia daun *S. polyanthum* Wight menunjukkan adanya kandungan minyak atsiri yang memiliki aroma harum (Sembiring dkk., 2003), polifenol (Lelono dkk., 2009), saponin, tanin, alkaloid, steroid, triterpenoid, fenolat, flavonoid dan karbohidrat (Kusuma dkk., 2011; Hidayati dkk., 2017; Liliwirianis dkk., 2011). Daun *S. polyanthum* Wight mengandung sekitar 0,17% minyak esensial dengan komponen penting eugenol dan metil kavikol (estragol) **(1)** (Agoes, 2010), sebagian besar juga mengandung senyawa golongan terpenoid (Arintawati, 2000) antara lain 30,445% skualen **(2)**, 6,573% n-heksatriakontan **(3)** (Alwani dkk., 2016), 43.489% cis-4-dekanal **(4)**, 19.752% 1-desil aldehida **(5)**, 14.092% kapril aldehida **(6)**, 2.271% α -kurkumin **(7)** dan 2.062% 1,2,3,3a,4,6a-heksahidropentalen **(8)** (Hamad dkk., 2017).



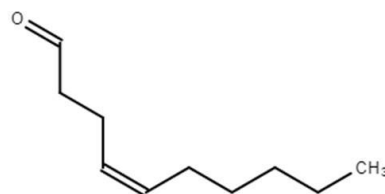
(1)



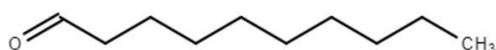
(2)



(3)



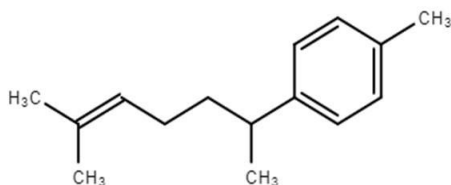
(4)



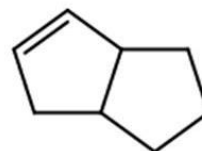
(5)



(6)

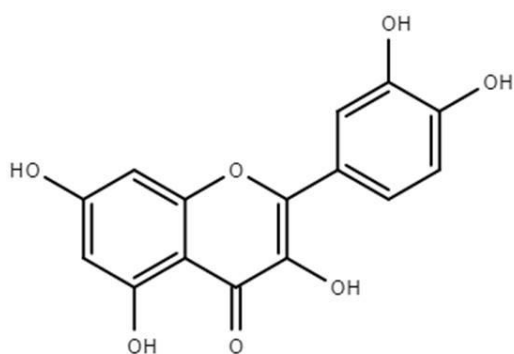


(7)

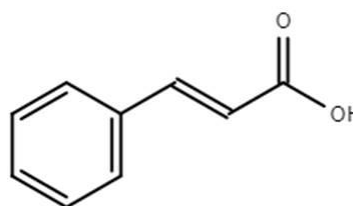


(8)

Menurut Farmakope Herbal Indonesia (2009), daun *S. polyanthum* Wight mengandung senyawa golongan flavonoid seperti kuersetin yang totalnya sebanyak 0,40% kuersetin (9). Senyawa golongan fenolat pada daun *S. polyanthum* Wight yang teridentifikasi yaitu asam fenolat, asam kafeat (asam sinamat) (10) dan asam galat. Daun *S. polyanthum* Wight juga mengandung beberapa vitamin diantaranya vitamin A, vitamin B₁ (thiamin), vitamin B₂ (riboflavin), vitamin B₃ (niasin), vitamin B₆, vitamin B₉ (folat), vitamin B₁₂ dan vitamin C (Har dan Ismail, 2012).

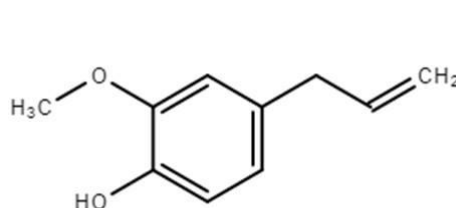


(9)

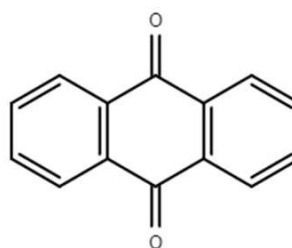


(10)

Senyawa golongan terpenoid dan fenolat seperti eugenol (11) pada ekstrak air dan metanol daun *S. polyanthum* Wight memiliki efek vasorelaksan sehingga dapat menurunkan tekanan darah (antihipertensi) dan melibatkan penghambatan reseptor β -adrenergik dan kolinergik melalui produksi nitrit oksid (Ismail dkk., 2013; Ameer dkk., 2010). Sedangkan senyawa golongan tanin dan flavonoid pada daun *S. polyanthum* Wight berperan terhadap efek antidiare. Senyawa tanin dapat menurunkan motilitas usus, mengikat protein agar terbentuk masa dan merusak dinding sel bakteri penyebab diare (Nurhalimah dkk., 2015). Daun *S. polyanthum* Wight juga memiliki kemampuan antiinflamasi yang dipengaruhi oleh senyawa golongan flavonoid dan saponin dengan mekanisme penghambatan pelepasan histamin sebagai salah satu mediator inflamasi. Penghambatan pelepasan histamin tersebut dapat menyebabkan penurunan inflamasi (Wientarsih dkk., 2007).



(11)

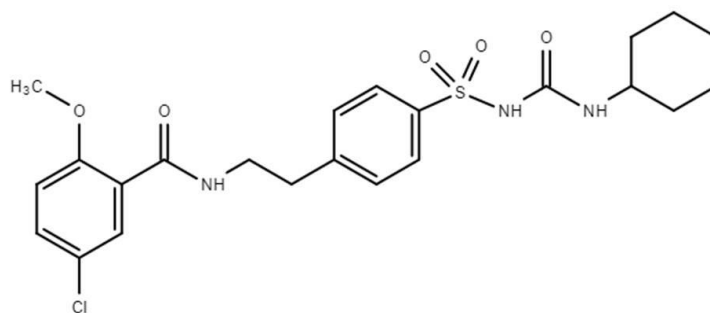


(12)

Ekstrak daun *S. polyanthum* Wight dapat menghambat bakteri *Methicilin Resistant of Staphylococcus Aureus* (MRSA) yang memiliki kemampuan setara dengan antibiotik ampicilin (Fifendy, 2014). Ekstrak etanol daun *S. polyanthum*

Wight juga dapat menghambat *Salmonella thypi*, *Tricophyton mentagrophytes* dan *Bacillus cereus* melalui mekanisme penghambatan sintesis dinding sel dan fungsi membran sel (Kusuma dkk., 2011). Senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, antrakuinon dan steroid dalam ekstrak metanol daun *S. polyanthum* Wight dapat menghambat *Salmonella thypi*, *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* (Hamad dkk., 2017; Evendi, 2017). Adanya kandungan antrakuinon (**12**) digunakan sebagai zat warna dan antibakteri, sedangkan senyawa golongan steroid sebagai antibakteri dan insektisida. Namun pada ekstrak n-heksana daun *S. polyanthum* Wight juga dapat menghambat *Salmonella typhimurium* (MIC 31,25 µg/mL) dan *Bacillus subtilis* (MIC 62,5 µg/mL) dengan adanya senyawa aldehid, fenolat dan terpen alkohol yang aktif sebagai antibakteri (Alwani dkk., 2016).

Daun *S. polyanthum* Wight mengandung senyawa golongan polifenol, flavonoid, terpenoid dan kumarin berperan dalam aktivitas antidiabetes (Patel dkk., 2012). Ekstrak etanol dan air daun *S. polyanthum* Wight mengandung fenolat, tanin, saponin (Sutrisna dkk., 2016) dan flavonoid yang mampu menangkap radikal bebas yang merusak sel β-pankreas, dimana kemampuan tersebut setara dengan glibenklamid (**13**) sebagai kontrol positif yang dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah tanpa terjadi efek hipoglikemik (Widharna dkk., 2010; Widharna dkk., 2015). Komponen tersebut mampu menurunkan kadar gula darah, mengatasi asam urat, stroke, kolesterol, melancarkan peredaran darah, radang lambung, diare serta gatal-gatal. Berdasarkan penelitian Berna dkk. (2015), ekstrak etanol daun *S. polyanthum* Wight juga dapat menghambat enzim α-glukosidase dengan IC₅₀ 19,06 µg/mL, menghambat enzim α-amilase 90,24% dan dipeptidyl peptidase IV 18,34%.



(13)

Ekstrak air dan etanol daun *S. polyanthum* Wight dengan metode DPPH menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang baik karena adanya senyawa antioksidan yang larut dalam air seperti flavonoid, fenolat, saponin dan tanin (Othman dkk., 2014; Ismail dkk., 2017). Kandungan flavonoid dan saponin juga dapat sebagai antioksidan, antikanker, dan antijamur. Asam galat, asam kafeat (asam sinamat) dan asam fenolat berperan penting terhadap kemampuan antioksidan dari ekstrak metanol daun *S. polyanthum* Wight (Har dan Ismail, 2012). Aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun *S. polyanthum* Wight dengan metode DPPH memiliki aktivitas antioksidan dengan EC₅₀ 20,09 µg/mL (Perumal dkk., 2012).

Berdasarkan penelitian sebelumnya dari Hidayati dkk. (2017), ekstrak daun *S. polyanthum* Wight dilarutkan dengan berbagai macam pelarut yang diuji menggunakan DPPH dan ABTS. Berdasarkan hasil terhadap radikal bebas DPPH, dan ABTS nilai IC₅₀ ekstrak daun *S. polyanthum* Wight ditunjukkan pada Tabel 2.1. Nilai IC₅₀ masing-masing ekstrak dihitung dengan regresi linier. Berdasarkan hasil interpolasi menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas tertinggi diantara ekstrak daun dengan pelarut lainnya. Ekstrak metanol memiliki aktivitas dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal bebas DPPH sebesar 44,35 µg/mL dan nilai IC₅₀ terhadap radikal bebas ABTS sebesar 17,69 µg/mL.

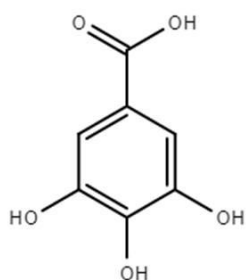
Tabel 2.1. Nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan dari ekstrak *S. polyanthum* Wight

Pelarut Ekstrak	DPPH	ABTS
	IC ₅₀ µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
<i>n</i> -Heksana	136,7	124,9
Diklorometana	126,1	53,0
Etil asetat	56,7	40,17
Metanol	44,35	17,69
Trolox	3,09	4,11

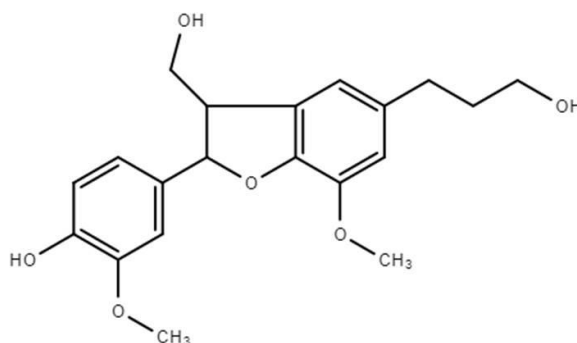
Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, penggunaan pelarut metanol menunjukkan aktivitas tertinggi pada hampir semua uji farmakologis. Ekstrak daun *S. polyanthum* Wight menggunakan pelarut metanol memiliki kandungan senyawa yang lebih banyak dibandingkan ekstrak daun *S. polyanthum* Wight

dengan pelarut lainnya. Pelarut metanol merupakan pelarut yang bersifat polar dan biasanya digunakan untuk ekstraksi. Pelarut semi polar maupun non polar hanya dapat mengambil beberapa senyawa dalam kandungan sampel, tidak seperti pelarut polar yaitu metanol yang dapat mengambil sebagian besar kandungan pada sampel.

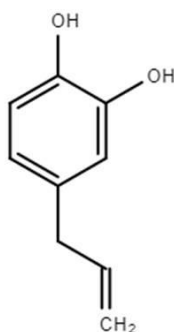
Berdasarkan penelitian dari Hidayati dkk. (2017) tersebut, dapat mengisolasi 2 senyawa dari ekstrak methanol daun *S. polyanthum* Wight yang selanjutnya dipartisi dengan pelarut *n*-heksana dan etil asetat dan menghasilkan beberapa fraksi. Hasil isolasi senyawa yang didapatkan pada subfraksi lanjutan dari fraksi etil asetat dapat didefinisikan sebagai senyawa asam 3,4,5-trihidroksibenzoat atau disebut asam galat (**14**) dan 2,3-dihidro-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3-(hidroksimetil)-7-metoksi-5-benzofuranpropanol (**15**).



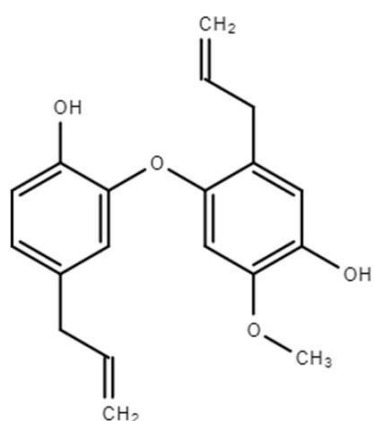
(14)



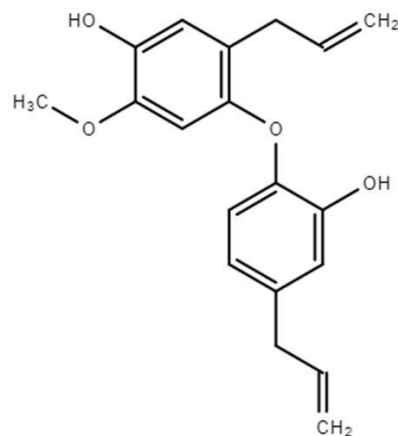
(15)



(16)



(17)



(18)

Berdasarkan penelitian dari Kato dkk. (2013), dari ekstrak methanol daun *S. polyanthum* Wight dapat mengisolasi 3 senyawa yang selanjutnya dipartisi dengan pelarut etil asetat dan menghasilkan 4 fraksi. Hasil isolasi senyawa didapatkan dari fraksi 1 yang dapat didefinisikan sebagai senyawa hidroksikavikol (16), dimer-dimer yang baru seperti 4-alil-1-hidroksi-2-(20-alil-40-hidroksi-50-metoksifenoksi)benzena (17) dan 4-alil-2-hidroksi-1-(20-alil-40-hidroksi-50-metoksifenoksi)benzena (18).

2.3 Metode Pemisahan dan Pemurnian

Penelitian menggunakan subjek senyawa bioaktif dari tanaman secara kualitatif dan kuantitatif bergantung pada pemilihan metode pemisahan dan pemurnian. Sebagian besar senyawa kimia ditemukan di alam dalam keadaan yang tidak murni namun tercampur dengan senyawa lain. Proses pemisahan dan pemurnian dilakukan untuk mendapatkan dua atau lebih produk yang lebih murni dari suatu campuran senyawa kimia, baik dalam skala laboratorium maupun skala industri. Senyawa bioaktif atau senyawa lain yang ada pada tumbuhan yang dapat diidentifikasi dari berbagai bagian tanaman seperti daun, batang, bunga dan buah-buahan (Azmir dkk., 2013). Keadaan senyawa yang diinginkan dalam campuran harus diperhatikan untuk menghindari kesalahan pemilihan metode pemisahan yang akan menimbulkan kerusakan hasil maupun tidak mendapat senyawa murni tersebut. Pengembangan metode kromatografi dan spektrometri modern yang dapat digunakan untuk menganalisis senyawa bioaktif lebih mudah dan

keberhasilan bergantung pada metode ekstraksi tanaman (Poole dkk., 1990). Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pemisahan suatu senyawa antara lain ukuran partikel, titik didih, kelarutan, adsorpsi, pengendapan, pelarut, temperatur, tekanan dan waktu (Hernandez dkk., 2009).

2.3.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan langkah awal preparasi sampel pada penelitian isolasi tanaman obat yang berperan penting bagi seorang peneliti dalam menentukan hasil akhir penelitian (Majors, 1999). Metode pemisahan ekstraksi dilakukan dengan cara melarutkan sampel dalam pelarut yang sesuai. Ekstraksi yang umum dilakukan dan tepat adalah dengan metode maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel padat menggunakan pelarut organik. Maserasi sering digunakan karena memiliki beberapa kelebihan antara lain dapat mengekstrak sampel padat dalam jumlah yang cukup besar, penggunaannya mudah, praktis dan dapat dilakukan pada suhu kamar sehingga senyawa-senyawa tidak akan terdekomposisi.

Proses yang terjadi selama perendaman sampel tanaman adalah terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara bagian dalam dan luar sel, sehingga senyawa metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Ekstraksi senyawa ini akan terjadi secara sempurna karena dapat mengatur lamanya proses perendaman sampel yang dilakukan. Pemilihan pelarut yang sesuai dengan senyawa bahan alam akan memberikan efektivitas yang tinggi.

2.3.2 Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan pelarut pada suatu lapisan zat tertentu. Prinsip metode pemisahan ini berdasarkan kelarutan dalam pelarut tertentu dan daya absorpsi oleh adsorben. Perbedaan pola pergerakan antara fasa gerak dan fasa diam akan terjadi pemisahan komponen dengan pelarut. Senyawa yang terlarut dalam fasa gerak akan melewati kolom dan keluar terlebih dahulu. Sedangkan, senyawa yang berikatan kuat dengan fasa diam akan tertahan di kolom dan cenderung

bergerak lebih lambat. Hal ini akan membuat senyawa-senyawa dalam campuran akan terpisah berdasarkan pergerakan pada kolom yang kemudian dapat dianalisis lebih lanjut.

Kromatografi cair vakum (KCV) dapat digunakan untuk sampel yang cukup banyak dan berdasarkan tingkat kepolarannya senyawa-senyawa lebih cepat terpisah secara adsorpsi dan partisi karena menggunakan tekanan tinggi (vakum) (Hostettmann dkk., 1997). Hasil pemisahan KCV dipengaruhi oleh pemilihan adsorben, diameter kolom, tinggi kolom, eluen yang tepat dapat memisahkan masing-masing komponen dengan baik, dan kecepatan elusi yang diinginkan. Campuran komponen dalam sampel dapat terpisah dengan baik menggunakan campuran pelarut. Penggunaan pelarut pada saat elusi umumnya menggunakan sistem *increasing polarity* dimulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah menuju ke pelarut yang kepolarannya lebih tinggi. Senyawa nonpolar umumnya dapat bergerak lebih cepat dalam kolom daripada senyawa polar (Markham, 1988).

Kromatografi kolom gravitasi (KKG) menggunakan prinsip berdasarkan pada distribusi kelarutan dan kemampuan adsorpsi bahan antara fasa diam (adsorben) dan fasa gerak (pelarut atau eluen). Metode ini sering disebut dengan kromatografi elusi karena senyawa yang terpisah akan terelusi dari kolom. Adsorben yang umum digunakan seperti silika gel dan menggunakan *glass wool* atau kapas. Ukuran kolom tergantung pada banyaknya senyawa yang akan dipisahkan. Proses elusi menggunakan sistem peningkatan kepolaran pelarut yaitu dari nonpolar ke polar dalam berbagai komposisi. Hal ini dapat menyebabkan senyawa yang polar akan diadsorpsi dalam kolom, sehingga senyawa yang lebih nonpolar akan terelusi terlebih dahulu sehingga tercapai pemisahan yang sempurna. Metode ini banyak digunakan untuk pemurnian senyawa setelah melewati KLT, misalnya untuk pemurnian karotenoid, klorofil, atau senyawa bioaktif tanaman lainnya (Sastrohamdjojo, 2002).

Metode kromatografi lapis tipis (KLT) dapat digunakan sebagai analisis kualitatif dan mengetahui sistem eluen yang digunakan dalam pemisahan dan pemurnian. Metode tersebut digunakan untuk menentukan eluen yang sesuai dan fraksi yang akan dipisahkan lebih lanjut. KLT digunakan untuk memisahkan

campuran yang tidak volatil. Adsorben (fasa diam) yang umum digunakan pada KLT adalah silika gel atau alumina. Pelarut (fasa gerak) yang terkena sampel akan terserap ke atas melalui plat berdasarkan gaya kapilaritas dengan laju yang berbeda, maka terjadilah pemisahan komponen pada sampel. Pemisahan komponen dapat diukur berdasarkan nilai R_f antara 0,2 - 0,8.

2.4 Metode Penentuan Struktur Senyawa

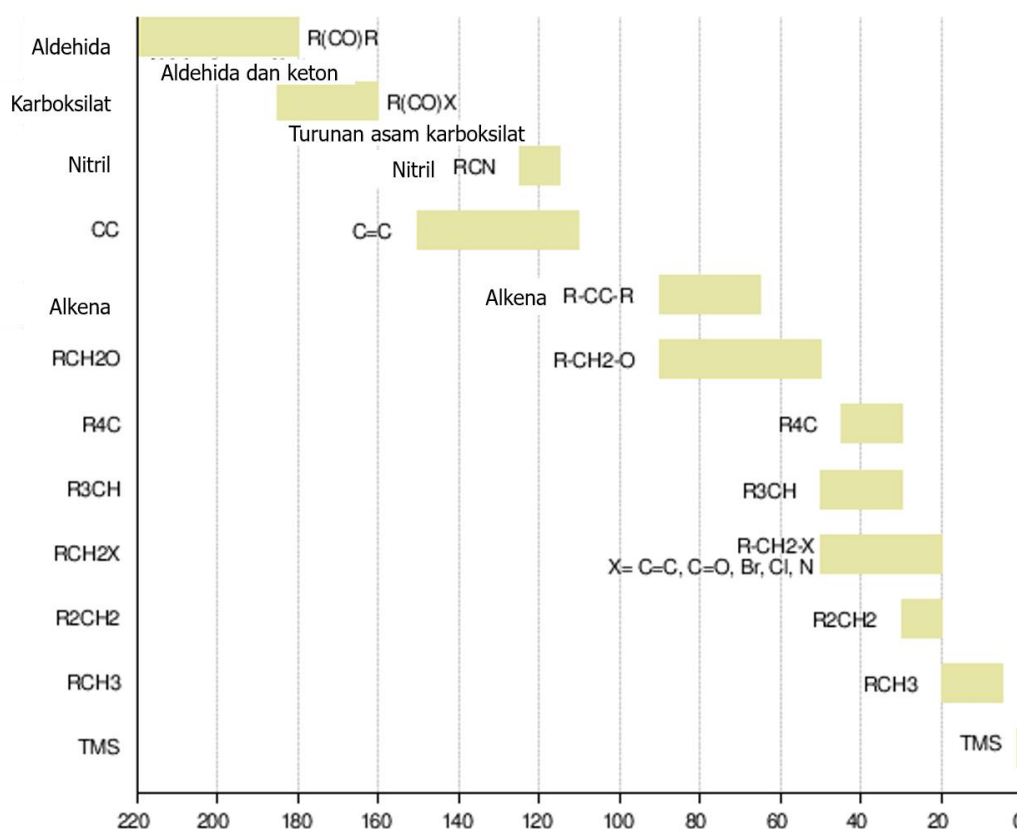
2.4.1 Spektroskopi ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR

Spektroskopi Magnetik Resonansi Inti (*Nuclear Magnetic Resonance* / NMR) adalah salah satu metode analisis paling mudah yang digunakan untuk menentukan struktur senyawa alami dan sintetis yang baru, kemurnian dari suatu komponen dan arah reaksi kimia. NMR memberikan gambaran jelas mengenai jenis atom, jumlah, tetangga dan lingkungan atom hidrogen (^1H -NMR) maupun karbon (^{13}C -NMR).

Spektroskopi NMR memiliki prinsip yang berdasarkan pada penyerapan radiasi elektromagnetik dengan gelombang radio oleh inti atom tertentu dalam molekul organik, apabila molekul tersebut berada dalam medan magnet yang kuat. Inti proton (hidrogen) dan karbon memiliki sifat-sifat magnet. Bila suatu senyawa mengandung hidrogen atau karbon diletakkan dalam bidang magnet yang sangat kuat dan terkena radiasi elektromagnetik maka inti atom hidrogen dan karbon dari senyawa tersebut akan menyerap energi melalui suatu proses absorpsi yang dikenal dengan resonansi magnetik. Absorpsi radiasi terjadi bila kekuatan medan magnet sesuai dengan frekuensi radiasi elektromagnetik. Spektra yang dihasilkan ^{13}C -NMR hanya dapat diperoleh dengan spektrometer yang sangat sensitif. Kelimpahan ^{13}C -NMR yang rendah akan membuat spektra ^{13}C -NMR lebih sederhana dibandingkan dengan spektra yang dihasilkan ^1H -NMR (Jeener dkk., 1979).

Setiap inti (hidrogen atau karbon) mempunyai perbedaan muatan, massa atom dan lingkungan kimia yang berbeda. Perbedaan dalam frekuensi resonansi sangat kecil, sehingga sangat sulit untuk mengukur secara tepat frekuensi resonansi setiap inti dalam molekul. Oleh karena itu, NMR menggunakan senyawa standar frekuensi yang ditambahkan dalam larutan senyawa yang akan

diukur dan frekuensi resonansi setiap proton dalam sampel diukur relatif terhadap frekuensi resonansi dari inti (hidrogen atau karbon) senyawa standar. Salah satu senyawa standar yang digunakan adalah tetrametilsilan $[(CH_3)_4Si]$, atau yang disebut dengan TMS. Senyawa ini dipilih karena proton-proton dari gugus metil jauh lebih terlindungi bila dibandingkan dengan sebagian besar senyawa pada sampel. Inti atom memiliki nilai pergeseran kimia (δ) yang merupakan ukuran relatif dari beberapa frekuensi resonansi terhadap referensi. Pergeseran kimia inti atom dibagi menjadi daerah rendah yang dekat dengan TMS disebut daerah medan magnet tinggi (*high shielded field*), sedangkan daerah yang jauh dari TMS disebut daerah medan rendah (*low shielded field*), yang ditunjukkan dengan gambar sebagai berikut :



Gambar 2.2 Pergeseran kimia 1H -NMR dan ^{13}C -NMR

2.4.2 Spektroskopi HMBC dan HMQC

Spektroskopi NMR 2D adalah satu perangkat spektroskopi resonansi magnet nuklir untuk menentukan hubungan atau korelasi dua inti atom dalam struktur molekul yang menghasilkan data plot pada dua sumbu frekuensi yang menggambarkan nilai pergeseran kimia dari inti atom H dan C yang lebih lengkap dari spektrum NMR 1D. Pengukuran NMR 2D yang umum digunakan antara lain *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC) dan *Homonuclear Multiple Bond Correlation* (HMQC). HMBC digunakan dalam penentuan korelasi jarak jauh (3 karbon) antara inti atom H dan C tetangga. HMQC digunakan dalam penentuan korelasi dari pergeseran kimia antara karbon dengan proton, yang menunjukkan posisi proton yang terikat langsung pada karbon (Schraml dkk., 1988). HMQC memberikan spektrum yang identik dengan HSQC (*Homonuclear Single Bond Correlation*) khusus untuk molekul yang lebih besar namun menggunakan metode yang berbeda. Penggunaan spektroskopi NMR 2D dapat melengkapi interpretasi data spektrum NMR 1D yang terlalu kompleks karena sebagian besar sinyal mengalami tumpang tindih, sehingga masih sulit menentukan struktur molekul secara utuh (Keeler dan James, 2010).

2.5 Aktivitas Antidiabetes

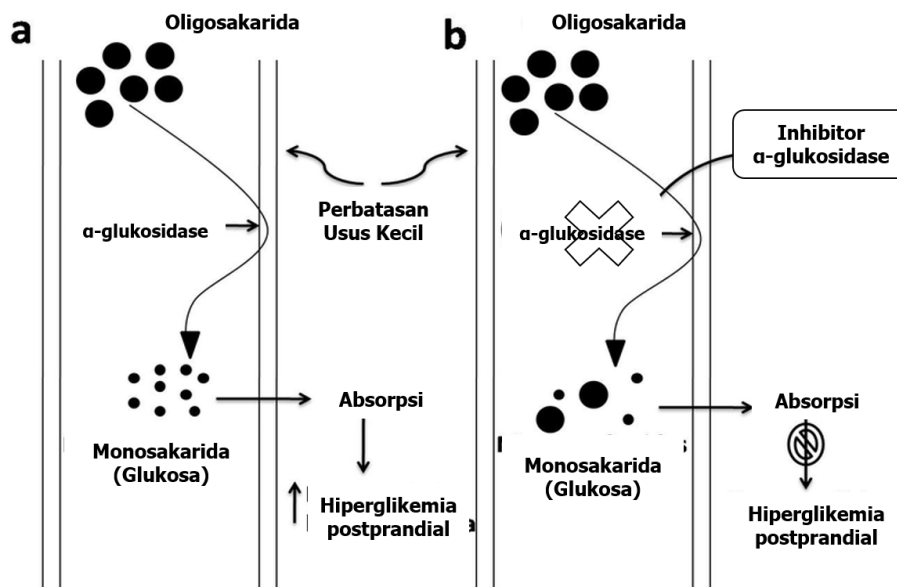
Diabetes melitus merupakan penyakit degeneratif yang ditandai dengan hiperglikemia akibat defisiensi insulin atau resistensi insulin atau keduanya oleh organ pankreas, dimana sel tidak dapat menyimpan glukosa. Tujuan pengobatan farmakoterapi untuk diabetes melitus adalah mengembalikan kadar glukosa darah menjadi normal pada penderita diabetes. Glukosa darah umumnya akan tersebar ke semua metabolisme jaringan aktif dalam tubuh. Insulin berperan sebagai hormon yang mengatur penyimpanan dan jalannya glukosa. Defisiensi insulin mengakibatkan metabolisme karbohidrat dalam tubuh tidak dapat diproses secara sempurna sehingga terjadi hiperglikemia (Khan dkk., 2003). Hiperglikemia adalah sebuah istilah yang menunjukkan kadar glukosa darah yang tinggi dimana lebih besar dari atau sama dengan 7,0 mmol/L atau 110 mg/dL (normal berkisar antara 4-6 mmol/L) saat berpuasa dan lebih besar dari 11,0 mmol/L atau 180 mg/dL

(normal berkisar 7,8 mmol/L) saat 2 jam setelah makan (WHO, 2016). Hiperglikemia yang akut dapat menjadi gejala utama diabetes yang dapat dikaitkan dengan kerusakan jangka panjang yaitu kegagalan fungsi organ seperti mata, ginjal, saraf, hati dan pembuluh darah (Richard dan Sue, 2015).

Penderita diabetes melitus tipe 2 harus melakukan terapi dalam mengontrol hiperglikemia sehingga dapat dilakukan pendekatan terapeutik dengan menunda absorpsi glukosa melalui penghambatan enzim pengurai karbohidrat yang terdapat pada organ pencernaan. Pengobatan secara oral merupakan cara pemberian obat yang paling umum digunakan terutama untuk penderita diabetes melitus tipe 2 yang meliputi senyawa-senyawa sulfonilurea, biguanida, meglitinide, thiazolidindion, dan sebagainya. Mekanisme ekstrak tanaman sebagai antidiabetes dalam menghambat kenaikan glukosa darah antara lain melalui penghambatan aktivitas enzim pemecah sukrosa dan karbohidrat, penghambatan absorpsi glukosa dan penghambatan aktivitas antiserotonin sehingga dapat menaikkan pelepasan insulin dari pankreas (Chattopadhyay, 1999).

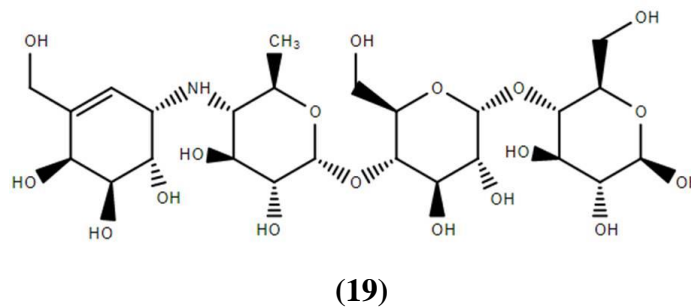
2.5.1 Penghambatan Enzim α -Glukosidase

Enzim α -glukosidase adalah enzim yang bertanggung jawab terhadap penguraian karbohidrat menjadi glukosa dengan memotong ikatan glikosida (Katzung dkk., 2009). Enzim-enzim α -glukosidase (maltase, isomaltase, glukomaltase dan sukrase) dapat menghidrolisis oligosakarida dan disakarida pada dinding halus usus menjadi gula yang lebih sederhana. Kemudian diserap ke dalam tubuh yang dapat meningkatkan kadar gula darah. Mekanisme kerja inhibitor enzim α -glukosidase secara kompetitif dan efektif dapat memperlambat penyerapan glukosa dengan menghambat enzim α -glukosidase dan amilase pada saluran pencernaan, sehingga akan terjadi pengurangan kadar glukosa darah (Shinde dkk., 2008), seperti pada gambar berikut ini:



Gambar 2.3 Mekanisme pencernaan karbohidrat (a) dan penghambatan α -glukosidase (b)

Inhibitor α -glukosidase yang umum digunakan merupakan senyawa yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat dan keduanya memiliki ikatan glikosida sehingga terjadi kompetisi antara inhibitor dan substrat untuk berikatan pada sisi aktif enzim. Beberapa inhibitor yang dapat menghambat α -glukosidase untuk mengatasi diabetes melitus tipe 2 secara klinis seperti akarbosa, voglibose dan miglitol. Akarbosa (19) dapat memperlambat penyerapan karbohidrat dan sukrosa sehingga dapat menekan hiperqlikemia. Akarbosa merupakan oligosakarida yang diperoleh dari mikroorganisme *Actinoplanes utahensis* dengan struktur senyawa (Bayer, 2011) sebagai berikut :



2.5.2 Penghambatan Enzim Aldosa Reduktase

Enzim aldosa reduktase merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis reduksi glukosa menjadi sorbitol dalam ginjal. Pada kondisi hiperglikemia, glukosa darah mengalami peningkatan sehingga enzim akan mengubah glukosa menjadi sorbitol. Pada saat yang sama, sorbitol teroksidasi menjadi fruktosa oleh sorbitol dehidrogenase (SDH) dengan adanya proses oksidasi NADPH menjadi NADP^+ dalam jalur poliol (hiperglikemia intrasel). Pembentukan sorbitol dalam sel meningkat sehingga tidak dapat melewati membran sel. Hal ini akan mengganggu osmoregulasi sel yang mengakibatkan kerusakan sel dan terjadi komplikasi diabetes (Logendra dkk., 2006). Oleh karena itu, pada kondisi hiperglikemia sangat diperlukan inhibitor aldosa reduktase untuk memperlambat proses terbentuknya sorbitol yang ditandai dengan penurunan NADPH.

Kondisi hiperglikemia menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan ROS. Metabolisme karbohidrat pada hiperglikemia akan menghasilkan energi yang sama untuk mensintesis ATP di mitokondria yang akan menghasilkan radikal bebas dan superoksidase karena pengaruh kadar glukosa yang tinggi. Autooksidasi glukosa juga akan meningkatkan radikal bebas menjadi stres oksidatif yang akan menurunkan kadar NO, merusak protein sel dan menghambat fungsi pertahanan tubuh. Hal tersebut juga dapat mengakibatkan meningkatnya modifikasi lipid, DNA dan protein pada berbagai jaringan. Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas sehingga terjadi kerusakan oksidatif yang disebut dengan stres oksidatif.

Stres oksidatif timbul jika adanya pembentukan ROS yang melebihi kemampuan sel dalam mengatasi radikal bebas, yang melibatkan sejumlah enzim dan vitamin bersifat antioksidan. Stres oksidatif pada diabetes melitus disebabkan karena ketidakseimbangan reaksi redoks akibat perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid, sehingga terjadi penurunan kapasitas antioksidan. Peredaman stres oksidatif diperlukan adanya antioksidan alami dari

luar tubuh manusia. Peningkatan suplai antioksidan yang cukup akan membantu pencegahan komplikasi diabetes melitus (Bambang dan Eko, 2005).

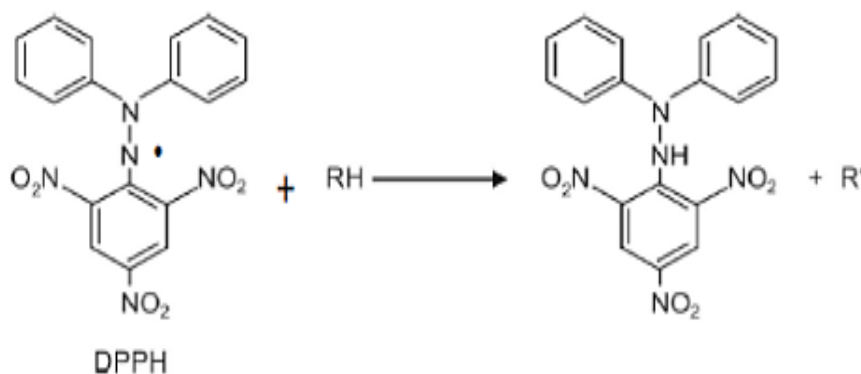
2.6 Aktivitas Antioksidan

Senyawa antioksidan memberikan perlindungan pada sel-sel dan jaringan terhadap radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas adalah senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan dan bersifat reaktif sehingga dapat menyerang elektron molekul lain. Radikal bebas yang terbentuk dalam jumlah besar akan meningkatkan stres oksidatif dan semakin banyak bagian lipida dan protein yang mengalami kerusakan. Radikal bebas dapat mempengaruhi kerja insulin sehingga kinerja insulin tidak akan maksimal dalam menurunkan glukosa dalam darah. Kerusakan ini yang akan menyebabkan rusaknya kinerja organ-organ dalam tubuh sehingga menimbulkan penyakit seperti gagal ginjal dan aterosklerosis serta beberapa penyakit degeneratif antara lain kanker, stroke, kardiovaskular, Alzheimer dan Parkinson (Maritim dkk., 2003).

Antioksidan adalah zat yang dapat ditemukan dalam bahan-bahan alami yang dapat melawan pengaruh radikal bebas (Tursiman dkk., 2012). Senyawa antioksidan yang berasal dari tanaman dapat menstabilkan atau menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan elektron untuk mencapai kondisi stabil sehingga dapat mencegah berbagai penyakit (Perumal dkk., 2012; Tursiman dkk., 2012). Antioksidan bertindak sebagai inhibitor atau menghambat proses oksidasi dimana dapat bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil. Banyak metode yang digunakan untuk mengukur kemampuan senyawa antioksidan dari tanaman. Dua radikal bebas yang umum digunakan untuk uji aktivitas antioksidan secara *in vitro* antara lain DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dan ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)).

2.6.1 Penghambatan DPPH

Metode penghambatan DPPH menerapkan uji dekolorisasi untuk mengidentifikasi adanya senyawa antioksidan yang dapat menetralkan radikal DPPH. DPPH memberikan pita serapan yang kuat pada panjang gelombang 517 nm. Metode penghambatan DPPH dapat digunakan untuk menguji senyawa antioksidan dari tanaman (Pourmorad dkk., 2006). Senyawa yang memiliki elektron bebas tidak berpasangan tersebut akan langsung berikatan dengan radikal bebas dan menjadi stabil, sehingga terjadi penurunan absorbansi dan larutan DPPH mengalami dekolorisasi karena terjadi perubahan warna dari ungu violet menjadi kuning terang (Ayoola dkk., 2008), seperti pada Gambar 2.4.



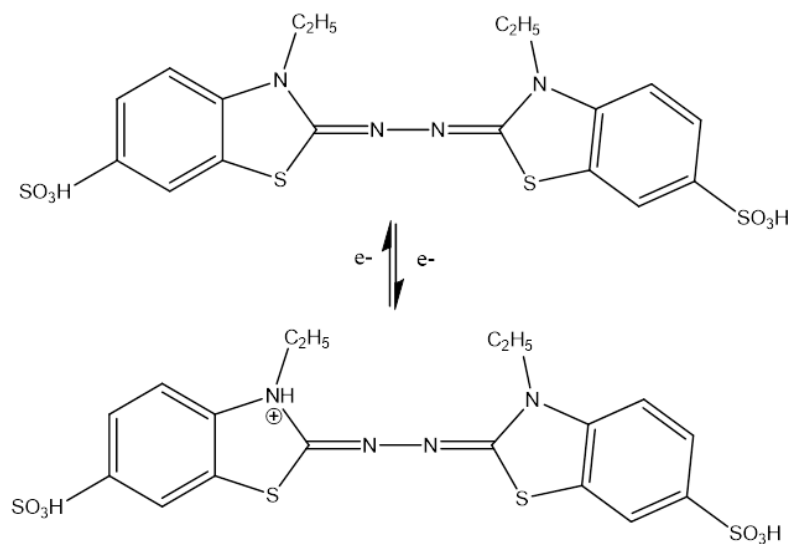
Gambar 2.4 Mekanisme penghambatan radikal DPPH

Banyak penelitian yang mengembangkan senyawa antioksidan dari bahan alami yaitu senyawa antioksidan dari tanaman seperti vitamin C, vitamin E, asam fenolat dan karotenoid. Beberapa senyawa dengan sifat fisik dan kimia hasil isolasi dari tanaman, seperti asam galat memiliki aktivitas antioksidan kuat yang umum digunakan sebagai standar (Patrick dkk., 2014; Biskup dkk., 2013).

2.6.2 Penghambatan ABTS

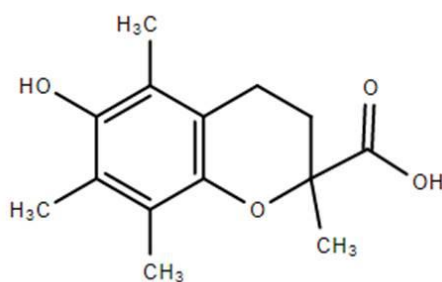
Seperti penghambatan DPPH, uji penghambatan ABTS juga menerapkan uji dekolorisasi untuk mengidentifikasi adanya senyawa antioksidan yang menetralkan radikal ABTS yang terbentuk. Pembentukan radikal ABTS berupa larutan berwarna biru gelap dapat ditunjukkan pada Gambar 2.5. Pada sebagian besar pengujian untuk menentukan sifat senyawa antioksidan, aktivitas ABTS

berkorelasi kuat dengan DPPH karena kedua metode tersebut bertanggung jawab atas sifat kimia yang sama dari donor elektron terhadap senyawa antioksidan (Rubalya dan Neelamegam, 2015).



Gambar 2.5 Mekanisme pembentukan radikal ABTS

Berbeda dengan DPPH, ABTS memberikan pita serapan yang kuat pada panjang gelombang 734 nm. Senyawa yang memiliki elektron bebas tidak berpasangan tersebut akan langsung berikatan dengan radikal bebas dan menjadi stabil, sehingga terjadi penurunan absorbansi dan larutan ABTS mengalami dekolorisasi karena terjadi perubahan warna dari biru-hijau menjadi tidak berwarna (Ayoola dkk., 2008; Pellegrini dkk., 1999). Metode penghambatan ABTS sebagai pengukur kemampuan senyawa antioksidan untuk menetralkan radikal ABTS yang dihasilkan dalam fasa air dan organik, dibandingkan dengan standar seperti trolox **(20)** (standar vitamin E yang larut dalam air) memiliki aktivitas senyawa antioksidan kuat (Shalaby dan Sanaa, 2013).

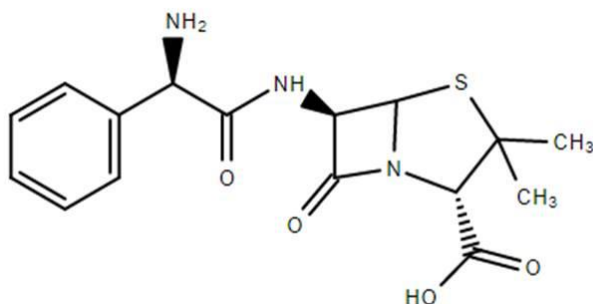


(20)

2.7 Aktivitas Antibakteri

Senyawa antibakteri adalah suatu senyawa kimia alami atau sintetis yang dalam konsentrasi rendah dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas bakteri yang bersifat merugikan (Pelczar dan Chan, 1988). Antibakteri hanya dapat digunakan jika memiliki sifat toksisitas selektif yang tinggi yang berarti dapat membunuh bakteri yang menyebabkan penyakit namun tidak beracun bagi penderitanya. Senyawa antibakteri dapat bersifat bakteriostatik, bakteriosidal atau bakteriolitik. Bakteriostatik adalah sifat menghambat pertumbuhan namun tidak membunuh bakteri. Bakteriosidal adalah sifat membunuh sel namun tidak terjadi lisis (sel pecah). Sedangkan bakteriolitik adalah sifat memecah sel yang mengakibatkan jumlah sel dalam bakteri berkurang (Fardiaz, 1986; Mahon dan Manuselis, 1995). Antibakteri dapat dikatakan memiliki spektrum sempit jika hanya menghambat bakteri gram positif, namun dikatakan memiliki spektrum luas jika dapat menghambat bakteri gram positif dan gram negatif. Mekanisme kerja antibakteri antara lain dapat menghambat sintesis dinding sel, menghambat sintesis protein, menghambat sintesis asam nukleat, menghambat jalur metabolisme dan menghambat integritas membran sel (Pelczar dan Chan, 1988).

Senyawa antibiotik merupakan senyawa antibakteri yang telah beredar di masyarakat sebagai obat berbagai jenis infeksi akibat kuman atau penyakit lainnya. Antibiotik adalah senyawa kimia tertentu yang dihasilkan oleh organisme (tanaman) atau mikroba dalam konsentrasi tertentu yang dapat menghambat atau membunuh mikroba lain. Salah satu antibiotik yang umum digunakan adalah ampicilin (**21**), yang merupakan turunan penisilin dari antibiotik β -laktam yang memiliki spektrum luas yang efektif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif (Morin dan Gorman, 1982). Ampicilin dapat menghambat sintesis dinding sel bakteri sehingga terjadi perbedaan tekanan osmosis bagian dalam dan luar sel sehingga mengakibatkan bakteri mati.



(21)

Metode dilusi cair dapat dijadikan alternatif untuk menentukan konsentrasi hambat minimum antibakteri. Aktivitas antibakteri yang tinggi bila pada konsentrasi antibakteri rendah mampu menghambat atau membunuh bakteri yang disebut Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) yang ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan. Metode dilusi cair menggunakan inokulum bakteri 10^4 sampai 10^8 CFU/mL. Metode tersebut memiliki sensitivitas lebih tinggi yaitu 30 kali lebih sensitif dibandingkan dengan metode difusi cakram. Metode ini dapat digunakan oleh berbagai macam mikroorganisme, murah dan menghasilkan hasil yang valid dengan replikasi yang diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm (Dirjen POM, 1995; Wattimena, 1987).

”Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain gelas kimia, erlenmeyer, pipet tetes, pipet kapiler, spatula, pinset, bejana pengembang (*chamber*), maserator, peralatan kromatografi cair vakum, peralatan kromatografi kolom gravitasi, neraca analitik, lampu UV, *rotary vacuum evaporator*, *vortex mixer*, mikropipet, *test tube*, tip, tabung falcon, *shaker incubator*, *96-microwell plate reader*.

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun *S. polyanthum* Wight, *n*-heksana, diklorometana, etil asetat, metanol, aseton dan kloroform. Silika gel 60 GF₂₅₄ untuk KKG (Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan), silika gel 60 GF₂₅₄ untuk KCV (Merck, Germany), plat KLT aluminium silika gel 60 GF₂₅₄ 20x20 cm (Merck, Germany), kertas saring, aluminium foil, pereaksi penampak noda serum sulfat (Ce(SO₄)₂), pelarut kloroform (CDCl₃) untuk NMR.

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas inhibitor α -glukosidase dan aldosa reduktase adalah enzim α -glukosidase (*Saccharomyces cerevisiae*), sukrosa, buffer HEPES, akarbosa, *Human recombinant aldose reductase* (HRAR), DL-gliseraldehida, β -NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), buffer *sodium phosphate*, kursetin, aquades, DMSO.

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl-hydrate), ABTS (2,2'-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)), K₂S₂O₈ (*potassium peroxydisulfate*), etanol, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) dan asam galat.

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah nutrient agar (NA), nutrient broth (NB), ampicilin, bakteri (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*) dari koleksi di Laboratorium Kimia Mikroorganisme, Departemen Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

3.2 Prosedur Isolasi Senyawa dari Daun *S. polyanthum* Wight

3.2.1 Ekstraksi Daun *S. polyanthum* Wight

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *S. polyanthum* Wight yang diperoleh dari Probolinggo, Jawa Timur. Daun tersebut dipotong menjadi ukuran kecil (ukuran 60 mesh) yang kemudian dikeringkan sehingga dihasilkan serbuk kering daun *S. polyanthum* Wight yang siap diekstraksi.

Serbuk kering daun *S. polyanthum* Wight dimasukkan ke dalam maserator sebanyak 3,5 kg dimaserasi selama 24 jam dengan 21 L pelarut metanol. Hasil maserasi yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak pekat sebanyak 245,2 gram.

3.2.2 Isolasi Senyawa dari Daun *S. polyanthum* Wight

Ekstraksi pekat metanol daun *S. polyanthum* Wight dilarutkan dalam metanol : H₂O (2:1) sebanyak 3 L kemudian dipartisi cair-cair dengan pelarut *n*-heksana dan etil asetat secara berurutan. Tiap hasil fraksinasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi *n*-heksana (73,34 gram), fraksi etil asetat (47,58 gram) dan fraksi air (47,56 gram).

Fraksi etil asetat memiliki aktivitas tertinggi dibanding fraksi lainnya, sehingga dilakukan proses pemisahan lebih lanjut. Fraksi etil asetat difraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) dan kromatografi kolom gravitasi (KKG) untuk menghasilkan pemisahan yang baik. Hasil fraksinasi dimonitoring dengan KLT, kemudian fraksi dengan R_f yang sama digabung. Hasil fraksinasi yang belum murni akan dilakukan proses pemisahan lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa, sedangkan hasil fraksinasi yang sudah murni akan dilanjutkan untuk mengidentifikasi senyawa menggunakan uji KLT 3 eluen, KLT 2 dimensi, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC dan HMQC.

3.3 Prosedur Uji Bioaktivitas

3.3.1 Aktivitas Inhibitor α -Glukosidase

Aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan berdasarkan metode penelitian dari Matsui dkk. (2001). Pelarut yang sesuai (metanol, DMSO, aquades) atau campuran ketiganya diambil 0,1 mL kemudian dimasukkan ke dalam dua tabung. Tabung A tanpa sampel uji (kontrol) dan tabung B dengan sampel uji. Kedua tabung ditambahkan enzim α -glukosidase (5 unit/mL) sebanyak 0,1 mL (dalam 0,15 M buffer HEPES) dan 0,1 mL sukrosa 0,1 M (dalam 0,15 M buffer HEPES). Campuran tersebut diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit kemudian dipanaskan pada 100 °C selama 10 menit untuk menghentikan reaksi. Akarbosa digunakan sebagai kontrol positif. Pembentukan glukosa ditentukan dengan metode oksidasi glukosa menggunakan biosensor BF-5S. Aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{(C_{\text{kontrol}} - C_{\text{sampel}})}{C_{\text{kontrol}}} \times 100 \% \quad (1)$$

3.3.2 Aktivitas Inhibitor Aldosa Reduktase

Aktivitas penghambatan enzim aldosa reduktase dengan *Human recombinant aldose reductase* (HRAR) dilakukan berdasarkan metode penelitian dari Nishimura (1998) dengan sedikit modifikasi. Campuran reaksi dibuat dari 500 μ L buffer *sodium phosphate* (pH 6,2) yang ditambahkan 100 μ L larutan sampel uji dalam DMSO, 100 μ L DL-gliseraldehida 10 mM, 195 μ L aquades, 100 μ L β -NADPH 0,15 mM. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* dan diinkubasi pada 25 °C selama 5 menit. Campuran tersebut ditambahkan 5 μ L enzim aldosa reduktase. Kuersetin digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan uji tanpa campuran sampel adalah kontrol negatif. Aktivitas penghambatan aldosa reduktase ditentukan dengan mengukur penurunan absorbansi pada 340 nm selama 10 menit menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Aktivitas penghambatan aldosa reduktase dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Penghambatan} = 1 - \left(\frac{\Delta A_{\text{sampel}/\text{menit}}}{\Delta A_{\text{kontrol}/\text{menit}}} \right) \times 100 \% \quad (2)$$

3.3.3 Aktivitas Antioksidan DPPH

Metode aktivitas antioksidan DPPH dilakukan berdasarkan metode penelitian dari Dudonne dkk. (2009) dengan sedikit modifikasi. Serbuk DPPH (1,182 mg) dilarutkan ke dalam 50 mL metanol, sehingga diperoleh larutan DPPH radikal 6×10^{-5} M yang nilai absorbansinya sekitar $0,98 \pm 0,02$ pada panjang gelombang 515 nm. Sampel uji (10 mg) dilarutkan ke dalam 1 mL metanol. Larutan sampel diambil 33 μ L dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH radikal. Trolox digunakan sebagai kontrol positif. Larutan blanko menggunakan 33 μ L metanol dalam 1 mL larutan DPPH radikal.

Larutan uji tersebut dihomogenasi menggunakan *vortex mixer* selama 10 detik, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 20 menit. Campuran larutan akan berubah warna dari ungu menjadi kuning pucat. Penurunan absorbansi ini diukur pada spektrofotometer UV pada panjang gelombang 515 nm. Metode ini dilakukan dengan tiga kali perulangan. Aktivitas penghambatan radikal DPPH dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{(A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{blanko}}} \times 100 \% \quad (3)$$

3.3.4 Aktivitas Antioksidan ABTS

Metode aktivitas antioksidan ABTS dilakukan berdasarkan metode penelitian dari Bang dkk. (2009) dengan sedikit modifikasi. Larutan ABTS 5 mL (7 mM) direaksikan dengan larutan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 88 μ L (140 mM) sehingga membentuk larutan ABTS radikal kation berwarna biru gelap dan diinkubasi di tempat gelap selama 12-16 jam pada suhu kamar. Larutan ABTS radikal kation ditambahkan etanol 99,5% hingga nilai absorbansinya sekitar $0,7 \pm 0,02$ pada panjang gelombang 734 nm. Sampel uji (10 mg) dilarutkan ke dalam 1 mL DMSO. Larutan sampel diambil 10 μ L dan ditambahkan 1 mL larutan ABTS radikal kation. Trolox digunakan sebagai kontrol positif. Larutan blanko menggunakan 10 μ L DMSO dalam 1 mL larutan ABTS radikal kation.

Larutan uji tersebut dihomogenasi menggunakan *vortex mixer* selama 10 detik, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 4 menit. Campuran larutan akan berubah warna dari biru menjadi tidak berwarna. Penurunan absorbansi ini diukur pada spektrofotometer UV pada panjang gelombang 734 nm. Metode ini dilakukan dengan tiga kali perulangan. Aktivitas penghambatan radikal ABTS dapat dihitung menggunakan rumus (3).

3.3.5 Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi cair berdasarkan metode penelitian dari Arias dkk. (2014) dengan sedikit modifikasi. Sampel uji (10 mg) dilarutkan ke dalam 1 mL DMSO. Suspensi bakteri (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*) 10⁴ CFU/mL sebanyak 50 µL ditambahkan dengan sampel 5 µL dalam tabung falcon yang telah berisi 445 µL media NB. Sampel uji diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam dengan *shaker incubator*. Ampisilin digunakan sebagai kontrol positif. DMSO digunakan sebagai kontrol negatif. Larutan blanko menggunakan sampel 5 µL dan 495 µL media NB. Metode ini dilakukan dengan tiga kali perulangan. Aktivitas antibakterial diukur *Optical Density* pada panjang gelombang 630 nm menggunakan *96-microwell plate reader* untuk mendapatkan absorbansi yang selanjutnya dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{\text{OD}_{630} \text{ kontrol negatif} - \text{OD}_{630} \text{ Sampel}}{\text{OD}_{630} \text{ Kontrol negatif}} \times 100 \% \quad (4)$$

(Quave dkk., 2008)

”Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Daun *S. polyanthum* Wight

Serbuk kering daun *S. polyanthum* Wight berukuran 60 mesh sebanyak 3,5 kg diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Metode maserasi merupakan metode yang efektif untuk mengekstrak sampel dalam jumlah besar pada suhu kamar dengan mengatur lamanya proses perendaman sampel dalam pelarut tertentu. Pelarut metanol merupakan pelarut yang bersifat polar dan efisien digunakan untuk ekstraksi. Pelarut metanol mampu mengambil lebih banyak senyawa-senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar maupun non polar dalam daun *S. polyanthum* Wight dibandingkan pelarut lainnya yang memiliki sifat lebih non-polar yang hanya akan mengambil senyawa non-polar (Azmir dkk., 2013). Berdasarkan penelitian Hidayati, dkk (2017) telah membuktikan bahwa dalam ekstrak metanol daun *S. polyanthum* Wight mengandung senyawa metabolit sekunder seperti saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, triterpenoid dan gula pereduksi, sedangkan dalam penggunaan pelarut yang lebih non-polar seperti etil asetat dan *n*-heksana hanya mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan terpenoid. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan pelarut metanol sangat efektif dalam metode ekstraksi daun.

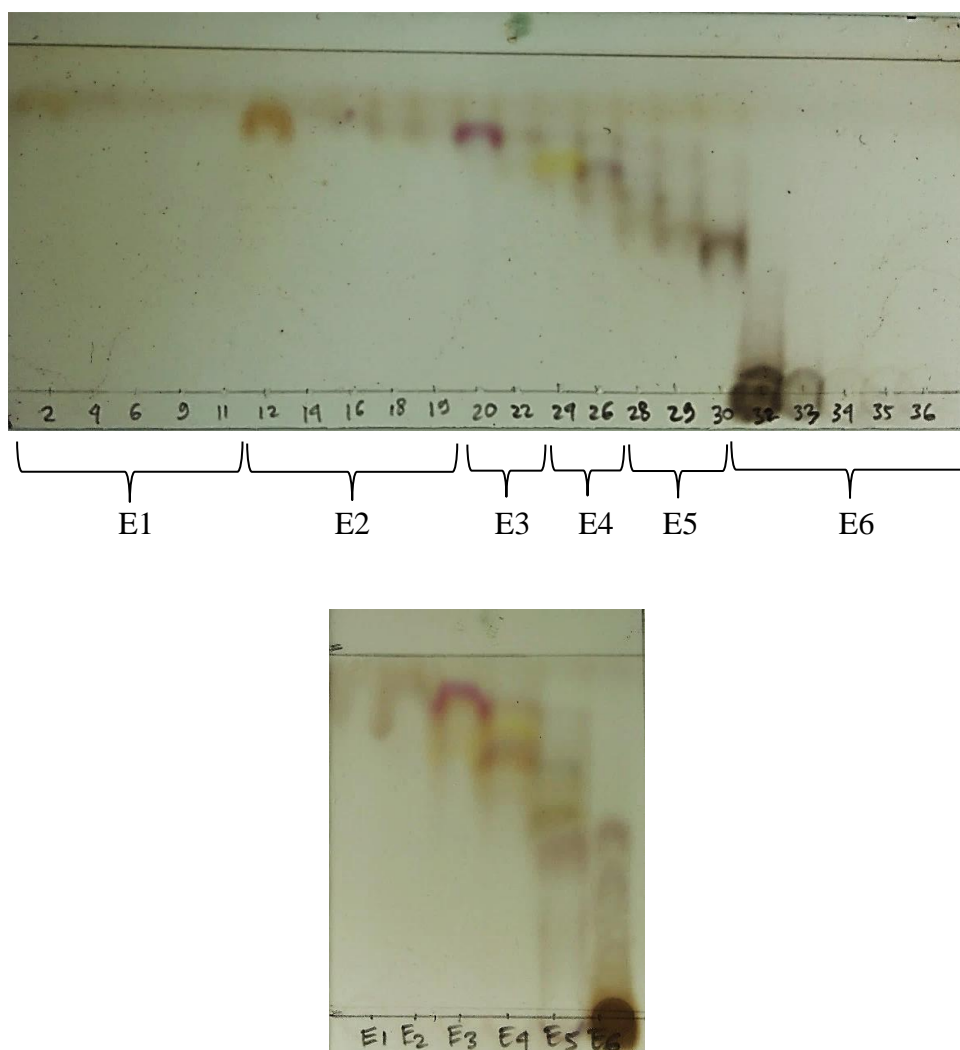
Hasil maserasi dalam ekstrak metanol daun *S. polyanthum* Wight sebanyak 245,2 gram. Ekstrak metanol daun *S. polyanthum* Wight diambil sebanyak 196,5 g kemudian dilarutkan dalam MeOH : H₂O (2:1) yang selanjutnya dipartisi dengan pelarut etil asetat dan *n*-heksana. Proses partisi tersebut menghasilkan fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana sesuai dengan kepolarannya. Setiap hasil partisi dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi *n*-heksana sebanyak 73,34 g, fraksi etil asetat sebanyak 47,58 g dan fraksi aqueous sebanyak 47,56 g. Berdasarkan penelitian Hidayati, dkk (2017) juga membuktikan bahwa hasil uji fitokimia dalam fraksi air dan fraksi etil asetat daun *S. polyanthum* Wight mengandung senyawa saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, triterpenoid dan gula pereduksi, sedangkan dalam fraksi *n*-heksana hanya mengandung senyawa

flavonoid, alkaloid dan terpenoid. Hal ini menunjukkan fraksi etil asetat dapat dilakukan proses pemisahan selanjutnya.

4.2 Isolasi Senyawa dari Daun *S. polyanthum* Wight

Fraksi etil asetat diperkirakan memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang lebih banyak dibanding dengan fraksi lainnya. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas tertinggi pada uji penghambatan α -glukosidase, aldosa reduktase, DPPH dan ABTS dibandingkan dengan fraksi lainnya, namun pada uji antibakteri fraksi etil asetat memiliki aktivitas rendah. Dari data-data tersebut, fraksi etil asetat dapat dilakukan proses pemisahan lanjutan dengan metode kromatografi untuk mendapatkan senyawa. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Kato, dkk (2013) yang telah melakukan isolasi senyawa dari ekstrak metanol daun *S. polyanthum* Wight yang selanjutnya dipartisi dengan pelarut etil asetat dan aquades. Fraksi-fraksi yang didapatkan dari fraksi etil asetat dilakukan pemisahan hingga mendapat senyawa tunggal. Senyawa-senyawa hasil isolasi yang didapatkan dalam penelitian tersebut adalah hidroksikavikol, 4-alil-1-hidroksi-2-(2'-alil-4'-hidroksi-5'-metoksifenoksi)benzena dan 4-alil-2-hidroksi-1-(2'-alil-4'-hidroksi-5'-metoksifenoksi)benzena.

Fraksi etil asetat (5,0338 g) tersebut dipisahkan lebih lanjut dengan metode kolom kromatografi gravitasi (KKG) menggunakan sistem eluen *increasing polarity* untuk menghasilkan pemisahan yang baik. Eluen yang digunakan adalah *n*-heksana : etil asetat (100:0 \rightarrow 0:100) dan metanol. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel. Kolom dibuat dengan tinggi kolom 21 cm dengan laju alir 4 mL/menit. Pemisahan ekstrak daun *S. polyanthum* Wight berupa fraksi-fraksi yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Senyawa yang memiliki kepolaran rendah akan turun terlebih dahulu daripada senyawa yang kepolarannya lebih tinggi. Hal tersebut terjadi karena perbedaan kemampuan adsorpsi oleh fasa diam terhadap senyawa-senyawa dalam ekstrak (Poole dkk., 1990). Hasil fraksinasi dimonitoring dengan KLT, kemudian fraksi dengan R_f yang sama digabung. Hasil pemisahan tersebut menghasilkan 6 fraksi antara lain Fraksi E1-E6 berdasarkan penggabungan noda yang memiliki R_f relatif sama. Pemisahan dan penggabungan fraksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan Tabel 4.1.

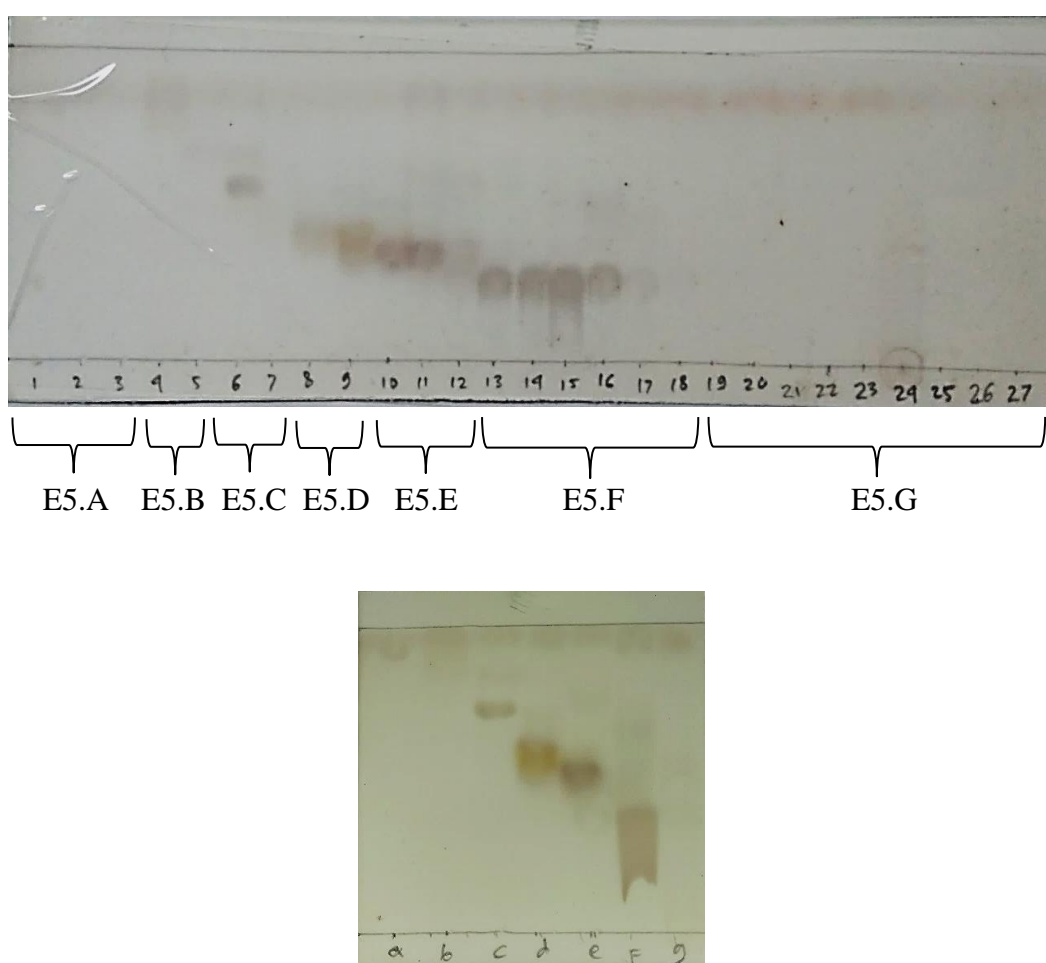


Gambar 4.1. Pemisahan dan Penggabungan Fraksi Etil Asetat (Fraksi E) dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (1 : 9)

Tabel 4.1. Pemisahan dan Penggabungan Fraksi Etil Asetat (Fraksi E)

Nama Fraksi	Nomor vial	Massa
E1	1-11	328,3 mg
E2	12-19	324,3 mg
E3	20-23	97,5 mg
E4	24-27	142,2 mg
E5	28-30	126,7 mg
E6	31-36	3,8 g

Fraksi E5 selanjutnya dipisahkan kembali dengan metode KKG. Eluen yang digunakan adalah diklorometana : etil asetat (100:0 → 0:100) dan metanol. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel. Kolom dibuat dengan tinggi kolom 10,5 cm dengan laju alir 3 mL/menit. Hasil fraksinasi dimonitoring dengan KLT, kemudian fraksi dengan Rf yang sama digabung. Hasil pemisahan tersebut menghasilkan 9 fraksi antara lain Fraksi E5.A - E5.G berdasarkan penggabungan noda yang memiliki Rf relatif sama. Pemisahan dan penggabungan fraksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Tabel 4.2.

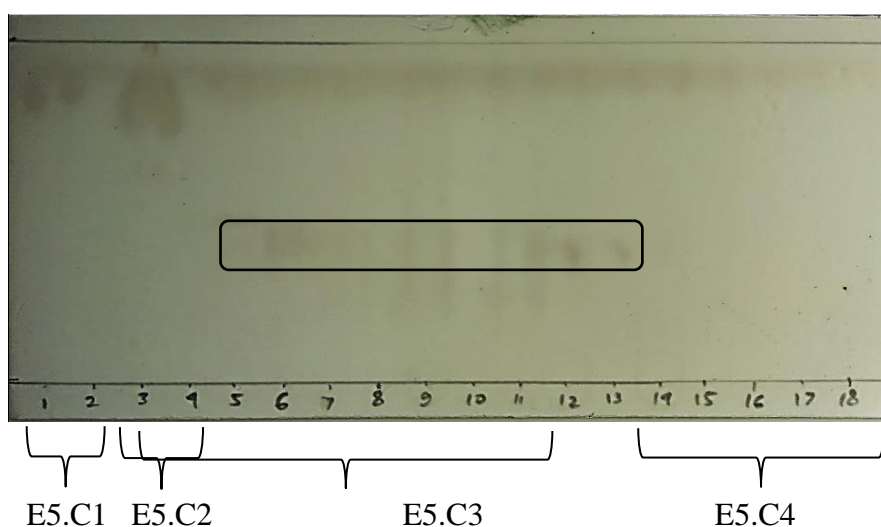


Gambar 4.2. Pemisahan dan Penggabungan Fraksi E5 dengan eluen diklorometana : etil asetat (3 : 7)

Tabel 4.2. Pemisahan dan Penggabungan Fraksi E5

Nama Fraksi	Nomor vial	Massa
E5.A	1-3	13,7 mg
E5.B	4-5	17,7 mg
E5.C	6-7	17,6 mg
E5.D	8-9	10,9 mg
E5.E	10-12	19,9 mg
E5.F	13-18	17,4 mg
E5.G	19-27	22,1 mg

Hasil fraksinasi yang belum murni akan dilakukan proses pemisahan lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa. Fraksi E5.C selanjutnya dipisahkan kembali KKG. Eluen yang digunakan adalah *n*-heksana : etil asetat (100:0 → 0:100) dan metanol. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel. Kolom dibuat dengan tinggi kolom 9 cm dengan laju alir 2,65 mL/menit. Hasil fraksinasi dimonitoring dengan KLT, kemudian fraksi dengan *R_f* yang sama digabung. Hasil pemisahan tersebut menghasilkan 4 fraksi antara lain Fraksi E5.C1 – E5.C4 berdasarkan penggabungan noda yang memiliki *R_f* relatif sama. Pemisahan dan penggabungan fraksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan Tabel 4.3.



Gambar 4.3. Pemisahan dan Penggabungan Fraksi E5.C dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (1 : 4)

Tabel 4.3. Pemisahan dan Penggabungan Fraksi E5.C

Nama Fraksi	Nomor vial	Massa
E5.C1	1-2	1,4 mg
E5.C2	3-4	0,6 mg
E5.C3	5-13	11,1 mg
E5.C4	14-18	3,5 mg

Fraksi E5.C3 yang didapatkan dari beberapa tahap pemisahan telah menghasilkan noda tunggal (Senyawa 1). Fraksi tersebut selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa menggunakan uji KLT 3 eluen, KLT 2 dimensi dan NMR.

4.3 Identifikasi Senyawa dari Daun *S. polyanthum* Wight

Senyawa 1 (Fraksi E5.C3) yang berbentuk padatan kuning (11,1 mg) tersebut larut dalam *n*-heksana, etil asetat dan kloroform, kemudian padatan tersebut diuji kemurnian menggunakan KLT dengan 3 eluen yang berbeda. Uji kemurnian tersebut dapat memberikan 1 noda memiliki R_f berbeda dengan berbagai eluen dan senyawa tersebut tidak bercampur dengan senyawa lain (Poole dkk., 1990). Eluen-eluen yang digunakan adalah diklorometana : metanol (95:5), *n*-heksana : etil asetat (1:4) dan diklorometana : etil asetat (1:99), yang dapat dilihat pada Gambar 4.4. Ketiga eluen tersebut menghasilkan nilai R_f yang berbeda yaitu 0,2, 0,48 dan 0,73. Nilai R_f tersebut berada di kisaran 0,2 - 0,8 dan merupakan nilai R_f yang baik.

Hasil monitoring KLT menunjukkan adanya noda tunggal pada tiga eluen tersebut. Hasil KLT tersebut juga didukung dengan KLT 2D menggunakan 2 eluen yang berbeda dalam 1 plat KLT yang dapat memperlihatkan adanya noda tunggal yang dapat dilihat pada Gambar 4.5. Eluen yang digunakan adalah diklorometana : etil asetat (1:99) dan *n*-heksana : etil asetat (1:4). Hal ini menunjukkan padatan kuning tersebut merupakan senyawa tunggal (Senyawa E5.C3).



diklorometana : metanol (95:5)

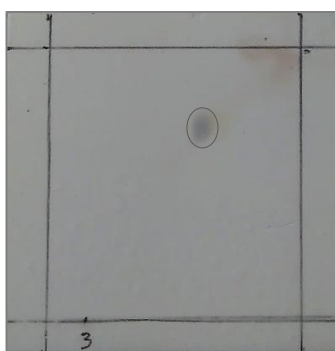


n-heksana : etil asetat (1:4)



diklorometana : etil asetat (1:99)

Gambar 4.4. Hasil KLT 3 eluen Senyawa 1 (Fraksi E5.C3)



1) diklorometana : etil asetat (1:99)

2) *n*-heksana : etil asetat (1:4)

Gambar 4.5. Hasil KLT 2 dimensi Senyawa 1 (Fraksi E5.C3)

Senyawa tunggal (Senyawa E5.C3) selanjutnya dilakukan identifikasi struktur menggunakan NMR 1D (^1H -NMR dan ^{13}C -NMR) dan NMR 2D (HMBC

dan HMQC). Spektroskopi ^1H -NMR digunakan untuk mengidentifikasi berbagai jenis dan jumlah proton serta lingkungannya, sedangkan spektroskopi ^{13}C -NMR untuk mengidentifikasi jumlah karbon yang terdapat dalam molekul dengan semua pergeseran kimianya sehingga dapat mengetahui sifat lingkungannya. Data tersebut untuk menentukan kerangka struktur kimia suatu senyawa. Pelarut kloroform (CDCl_3) digunakan untuk pengukuran ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR dengan frekuensi 400 MHz. Pemilihan pelarut yang digunakan berdasarkan kelarutan senyawa uji.

Tabel 4.4. Data pergeseran kimia ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR senyawa E5.C3 (pelarut kloroform, 400 MHz)

Karbon	Senyawa E5.C3	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	-
2	7,69 (1H, dd)	130,99
3	-	128,89
4	-	-
5	6,59 (d)	-
6	7,52 (1H, dd)	128,89
1'	3,89 (d)	38,79
2'	4,95 (dd)	-
3'	-	132,52
4'	1,26 (m)	29,73
5'	1,26 (m)	23,31
1''	-	167,88
2''	4,20 (m)	68,24
3''	0,88	14,20

Data-data sinyal pergeseran kimia δ_{H} (ppm) dan δ_{C} (ppm) senyawa E5.C3 dapat dilihat pada Tabel 4.4. Penentuan struktur menggunakan data spektrum ^1H -NMR pada senyawa E5.C3 menunjukkan adanya beberapa sinyal proton yaitu

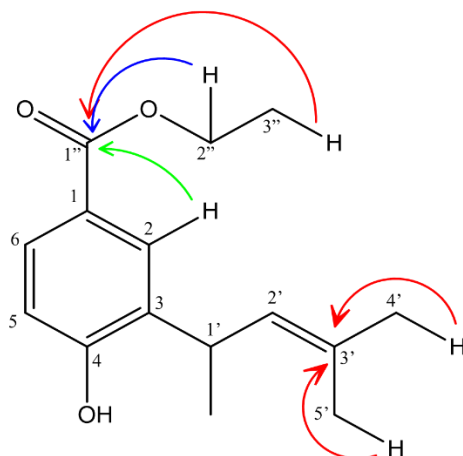
sinyal proton metin, aromatik dan karboksilat. Sinyal pada pergeseran δ_H (ppm) 4,95 (dd) dan 4,20 (m) menunjukkan adanya sinyal proton metin dengan lingkungan yang berbeda. Sinyal proton aromatik ditunjukkan pada pergeseran δ_H (ppm) 7,52 – 7,69 (1H, dd). Penentuan struktur dengan ^{13}C -NMR menunjukkan adanya beberapa sinyal karbon metin, metil aromatik dan karbonil. Sinyal pada pergeseran δ_C (ppm) 167,88 menunjukkan gugus -COOR dan δ_C (ppm) 68,24 menunjukkan gugus O-CH₂-R. Sinyal proton aromatik ditunjukkan pada pergeseran δ_C (ppm) 128,89 dan 132,52 dimana kedua pergeseran memiliki lingkungan yang berbeda.

Tabel 4.5. Data korelasi HMQC dan HMBC senyawa E5.C3

Karbon	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Korelasi HMBC
	HMQC		
1	-	-	-
2	130,99	7,69 (1H, dd)	C-1''
3	128,89	-	-
4	-	-	-
5	-	6,59 (d)	-
6	128,89	7,52 (1H, dd)	-
1'	38,79	3,89 (d)	-
2'	-	4,95 (dd)	-
3'	132,52	-	-
4'	29,73	1,26 (m)	C-3'
5'	23,31	1,26 (m)	C-3'
1''	167,88	-	-
2''	68,24	4,20 (m)	C-1''
3''	14,20	0,88	C-1''

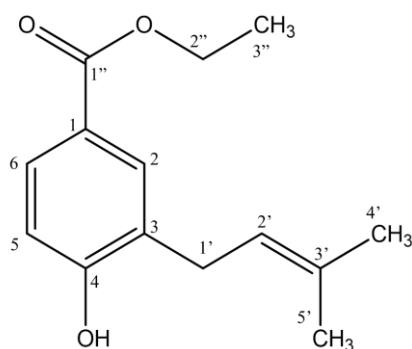
Pengukuran 2D-NMR seperti *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC) dan *Homonuclear Multiple Bond Correlation* (HMQC) dengan pelarut kloroform dan frekuensi 400 MHz dapat dilihat dalam Tabel 4.5. Korelasi HMBC

untuk mengetahui korelasi jarak jauh (3 karbon) antara proton dan karbon tetangga. Korelasi HMQC digunakan untuk mengetahui korelasi dari pergeseran kimia antara karbon dengan proton, yang menunjukkan posisi proton yang terikat langsung pada karbon. Berdasarkan data HMBC dan HMQC tersebut diperoleh korelasi jarak jauh antara proton dengan karbon tetangga.



Gambar 4.6. Korelasi HMBC senyawa E5.C3

Berdasarkan data HMBC yang ditunjukkan pada Gambar 4.6, adanya korelasi antara proton δ_H (ppm) 7,69 dengan C kuartener pada cincin aromatik yang menunjukkan bahwa terdapat gugus karboksilat dengan keelektronegatifan besar yang tersubstitusi pada cincin aromatik dibandingkan proton δ_H (ppm) 7,52 tetangga yang berikatan dengan hidroksil. Adanya pengaruh dari karboksilat yang memiliki elektronegatifitas yang besar terhadap proton δ_H (ppm) 4,20 dan lingkungan yang dekat dengan 2 gugus metil sehingga proton tersebut lebih terlindungi (*shielding*) dan pergeseran kimia tidak jauh dari standar tersebut mengalami δ_H (ppm) 4,95 karena proton tersebut kurang terlindungi (*deshielding*). Pada 2 gugus metil yang serupa dan terletak pada gugus metin yang memiliki tetangga dengan karboksilat ditunjukkan pada pergeseran kimia δ_H (ppm) 1,26 tersebut kurang terlindungi (*deshielding*) dibandingkan gugus metil yang memiliki tetangga hidroksil pada pergeseran kimia δ_H (ppm) 0,88.



Gambar 4.7. Struktur senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat)

Berdasarkan data analisis 1D dan 2D NMR tersebut, dapat diperoleh kesimpulan bahwa senyawa E5.C3 merupakan senyawa berbentuk padatan senyawa etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat yang ditunjukkan pada Gambar 4.7. Senyawa tersebut memiliki bentuk molekul $C_{13}H_{16}O_3$. Senyawa ini merupakan turunan dari senyawa asam karboksilat aromatik yang memiliki 1,3,4-trisubstitusi dan termasuk golongan fenolat. Senyawa fenolat merupakan senyawa yang terdiri dari satu atau lebih cincin aromatik dengan gugus hidroksi pada posisi yang berlainan. Senyawa fenolat memiliki aktivitas penghambatan terhadap radikal bebas atau sebagai antioksidan. Senyawa yang memiliki jumlah dan posisi gugus hidroksi serta tipe substituen yang berikatan pada cincin aromatik berpengaruh terhadap besar kecilnya aktivitas antioksidan. Dalam struktur tersebut terdapat gugus hidroksi yang memiliki posisi para dengan gugus karboksilat dan menunjukkan senyawa tersebut dapat meningkatkan aktivitas antioksidan. Panjang ikatan ester pada karboksilat juga dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan menjadi semakin kecil. Senyawa fenolat juga dapat menghambat aktivitas enzim aldosa reduktase dengan mencegah pembentukan gliseraldehid menjadi gliserol dan glukosa menjadi sorbitol ditandai dengan penurunan konsentrasi NADPH (Chetan dkk., 2011). Senyawa ini dapat ditemukan dalam tanaman dan umumnya dapat digunakan secara luas dalam industri makanan.

Penentuan struktur senyawa E5.C3 hanya dengan menggunakan 1H -NMR dan ^{13}C -NMR belum dapat digunakan untuk mengetahui struktur senyawa secara utuh, sehingga sangat diperlukan data-data pendukung lainnya. Data-data yang

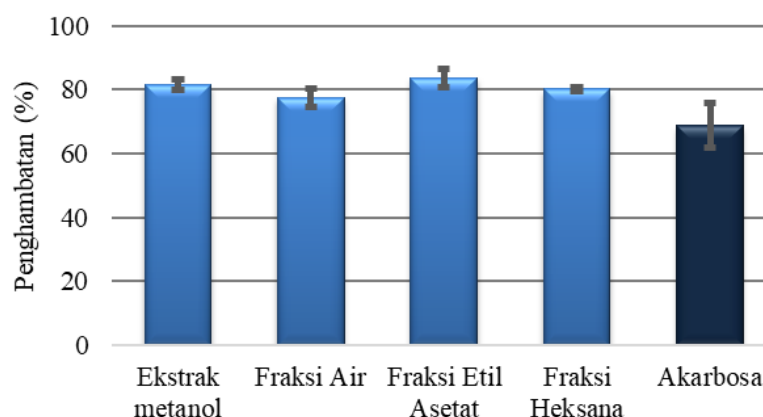
dapat digunakan adalah literatur mengenai pergeseran kimia senyawa-senyawa hasil isolasi tanaman yang memiliki satu famili atau genus dengan daun *S. polyanthum* Wight. Faktor yang mempengaruhi adalah geografis, iklim, ekosistem habitat, topologi dan bagian tumbuhan yang digunakan (Venkataraman, K., 1972). Beberapa hasil literatur atau penelitian sebelumnya mengenai pergeseran kimia senyawa-senyawa hasil isolasi daun *S. polyanthum* Wight menunjukkan kemiripan struktur dengan senyawa etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat pada hasil isolasi senyawa turunan komponen utama metil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat dari *Piper guanacastensis* (Miranda, 1997). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa senyawa etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat pernah diisolasi sebelumnya dari tanaman lain.

4.4 Uji Bioaktivitas

4.4.1 Aktivitas Inhibitor α -Glukosidase

Penghambatan penyakit diabetes salah satunya dilakukan dengan menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Enzim α -glukosidase adalah enzim yang bertanggung jawab terhadap penguraian karbohidrat menjadi glukosa dengan memotong ikatan glikosida (Katzung dkk., 2009). Penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan oleh suatu inhibitor yang secara kompetitif dan efektif memperlambat penyerapan glukosa melalui hidrolisis enzim α -glukosidase dan amilase dalam saluran pencernaan.

Inhibitor yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana daun *S. polyanthum* Wight. Uji aktivitas pada ekstrak dan fraksi-fraksi ini digunakan untuk mengetahui besarnya aktivitas biologis dari senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Hasil uji penghambatan enzim α -glukosidase pada ekstrak metanol sebesar 81,60% lebih baik dibandingkan kontrol positif akarbosa sebesar 68,8%. Sedangkan hasil uji penghambatan pada fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana secara berturut-turut adalah 77,55%, 83,73% dan 80,28%. Penghambatan enzim α -glukosidase pada ekstrak metanol, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 333 $\mu\text{g/mL}$ tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.8 sebagai berikut:



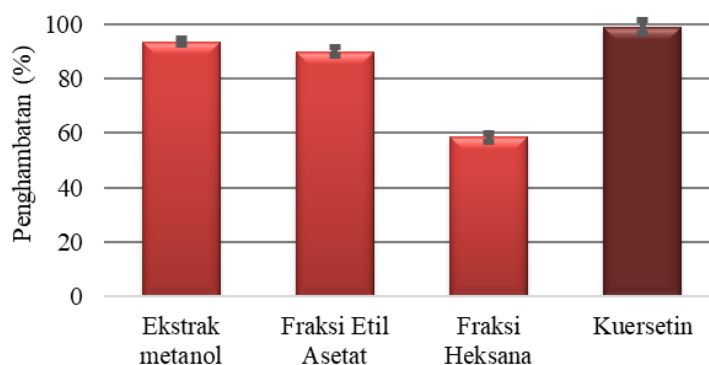
Gambar 4.8. Penghambatan enzim α -glukosidase pada daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 333 $\mu\text{g/mL}$

4.4.2 Aktivitas Inhibitor Aldosa Reduktase

Penghambatan penyakit diabetes juga dilakukan dengan menghambat aktivitas enzim aldosa reduktase. Enzim aldosa reduktase merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis reduksi glukosa menjadi sorbitol dan oksidasi sorbitol menjadi fruktosa dalam ginjal. Pada kondisi hiperglikemia, kadar glukosa meningkat dan produksi sorbitol lebih cepat (Fatmawati dkk., 2011). Penghambatan enzim aldosa reduktase pada kondisi hiperglikemia sangat diperlukan karena dapat memperlambat proses terbentuknya sorbitol yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Kadar glukosa darah ditentukan berdasarkan intensitas warna yang terjadi dan diukur secara spektrofotometri (Widowati dan Sa'roni, 1997).

Ekstrak metanol, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana daun *S. polyanthum* Wight adalah inhibitor yang digunakan untuk diuji aktivitasnya terhadap enzim aldosa reduktase. Hasil uji penghambatan enzim aldosa reduktase pada kontrol positif kuersetin sebesar 99,02% lebih besar dibandingkan ekstrak metanol sebesar 93,65% dengan IC_{50} sebesar 6,12 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan hasil uji penghambatan pada fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana adalah 89,92% dan 58,57%. Penghambatan enzim aldosa reduktase pada ekstrak metanol, fraksi air,

fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 100 µg/mL tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.9 sebagai berikut:

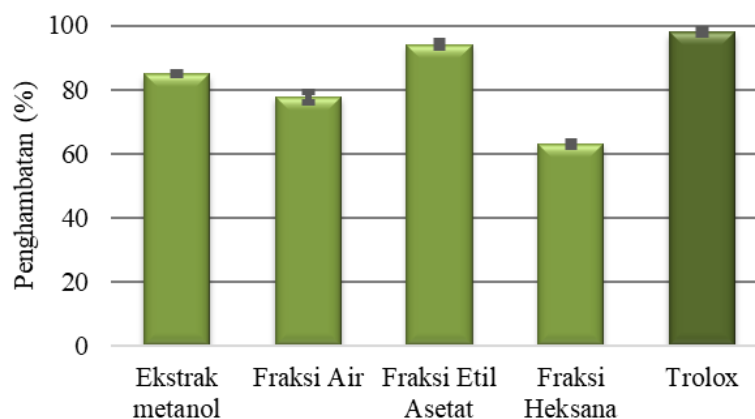


Gambar 4.9. Penghambatan enzim aldosa reduktase pada daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 100 µg/mL

4.4.3 Aktivitas Antioksidan DPPH

Penghambatan komplikasi diabetes dapat dilakukan dengan memberikan antioksidan antara lain dengan metode penghambatan aktivitas DPPH. Aktivitas penghambatan ini diukur dengan menambahkan larutan DPPH radikal ke dalam ekstrak dan fraksi-fraksi daun *S. polyanthum* Wight menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Aktivitas penghambatan DPPH berdasarkan perhitungan (3) dan diperoleh nilai absorbansi dengan adanya perubahan warna dari ungu menjadi kuning pucat.

Hasil uji penghambatan DPPH pada kontrol positif trolox sebesar 97,88% dengan IC_{50} sebesar 4,36 µg/mL merupakan nilai penghambatan tertinggi dibandingkan sampel lain. Hasil uji penghambatan pada ekstrak metanol yaitu sebesar 84,85% dengan IC_{50} sebesar 44,35 µg/mL. Hasil uji penghambatan pada fraksi etil asetat adalah 94,08% dengan IC_{50} sebesar 21,75 µg/mL. Sedangkan hasil uji penghambatan pada fraksi air dan fraksi n-heksana secara berturut-turut adalah 77,64% dan 62,94%. Penghambatan DPPH pada ekstrak metanol, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 159,73 µg/mL tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.10 sebagai berikut:

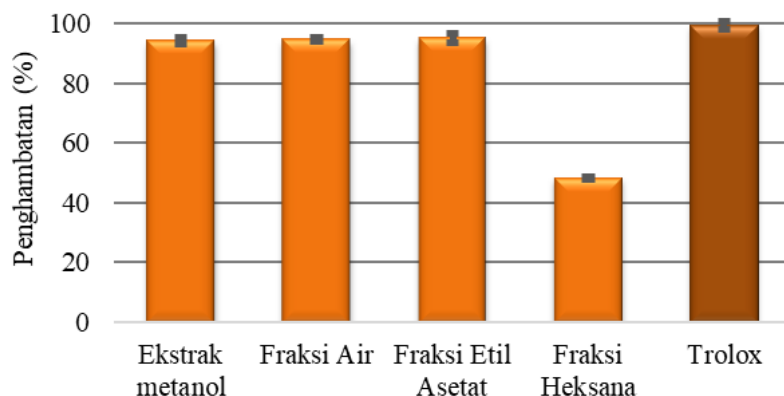


Gambar 4.10. Penghambatan DPPH pada daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 159,73 $\mu\text{g/mL}$

4.4.4 Aktivitas Antioksidan ABTS

Penghambatan komplikasi diabetes dapat dilakukan dengan memberikan antioksidan antara lain dengan metode aktivitas penghambatan ABTS. Aktivitas penghambatan ini diukur dengan menambahkan larutan ABTS radikal ke dalam ekstrak dan fraksi-fraksi daun *S. polyanthum* Wight menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Aktivitas penghambatan ABTS berdasarkan perhitungan (3) dan diperoleh nilai absorbansi dengan adanya perubahan warna dari biru menjadi tidak berwarna.

Hasil uji penghambatan ABTS pada kontrol positif trolox sebesar 99,52% dengan IC_{50} sebesar 5,25 $\mu\text{g/mL}$ merupakan nilai penghambatan tertinggi dibandingkan sampel lain. Hasil uji penghambatan pada ekstrak metanol yaitu sebesar 94,33% dengan IC_{50} sebesar 17,69 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji penghambatan pada fraksi etil asetat adalah 95,12% dengan IC_{50} sebesar 11,82 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan hasil uji penghambatan pada fraksi air dan fraksi n-heksana secara berturut-turut adalah 94,81% dan 48,27%. Penghambatan ABTS pada ekstrak metanol, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 49,5 $\mu\text{g/mL}$ tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.11 sebagai berikut:

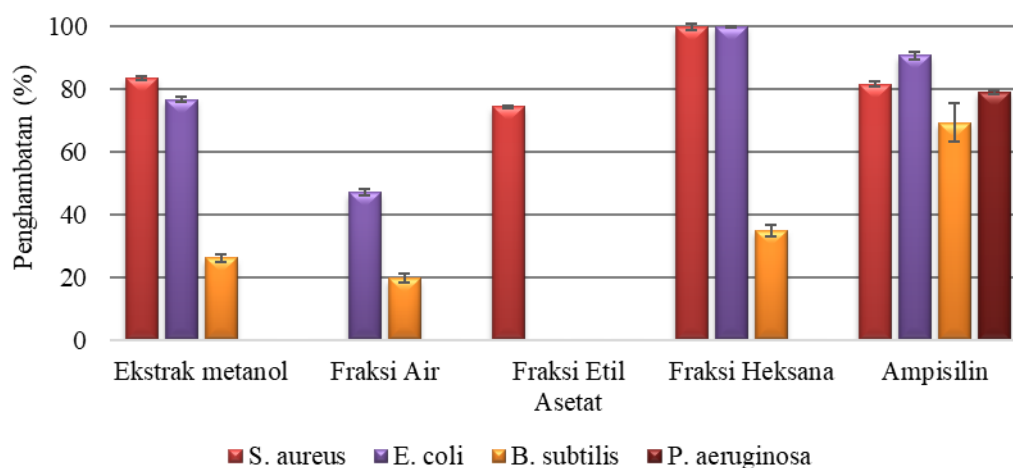


Gambar 4.11. Penghambatan ABTS pada daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 49,5 µg/mL

4.4.5 Aktivitas Antibakteri

Penghambatan aktivitas bakteri dalam tubuh dapat dilakukan dengan penambahan zat antibakteri yang terdapat dalam tanaman. Hal ini dapat diuji dengan salah satu metode yang efektif yaitu dilusi cair. Metode dilusi cair dapat diaplikasikan untuk menentukan konsentrasi antibakteri terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri yang terlihat atau nilai IC_{50} . Dibandingkan dengan metode lain, metode dilusi cair lebih efektif dan efisien (Hassan dkk., 2009). Metode dilusi cair lebih sensitif daripada metode dilusi agar atau difusi agar, sehingga metode ini paling tepat untuk penentuan aktivitas antibakteri ekstrak tanaman secara kuantitatif dan cepat. Metode dilusi cair ini lebih sederhana dalam penggunaan biaya, bakteri dan ekstrak tanaman (Arias dkk., 2004). Aktivitas penghambatan ini diukur dengan menambahkan ekstrak dan fraksi-fraksi daun *S. polyanthum* Wight ke dalam suspensi bakteri (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*) yang selanjutnya dibandingkan dengan kontrol positif (Ampisilin) dan kontrol negatif (DMSO). Aktivitas antibakterial diukur *Optical Density* pada panjang gelombang 630 nm menggunakan *96-microwell plate reader* untuk mendapatkan absorbansi. Penghambatan bakteri (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*) pada ekstrak metanol, fraksi air, fraksi etil

asetat dan fraksi n-heksana daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 100 µg/mL tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.12 sebagai berikut:



Gambar 4.12. Penghambatan bakteri (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*) pada daun *S. polyanthum* Wight pada konsentrasi 100 µg/mL

Aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol dan fraksi-fraksi daun *S. polyanthum* Wight daun terhadap 4 bakteri patogen telah ditunjukkan pada Gambar. 4.12. Sebanyak 4 bakteri patogen yang digunakan dalam uji antibakteri adalah bakteri Gram-positif (*S. aureus* dan *B. subtilis*) dan Gram-negatif (*E. coli* dan *P. aeruginosa*). Ekstrak metanol dan fraksi n-heksana menunjukkan aktivitas antibakteri lebih tinggi (>80%) dibandingkan kontrol positif ampisilin terhadap bakteri *S. aureus* tetapi penghambatan fraksi etil asetat sedikit lebih rendah. Fraksi n-heksana (>90%) menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi daripada ampisilin terhadap bakteri *E. coli* tetapi penghambatan ekstrak metanol dan fraksi air lebih rendah. Ekstrak metanol, fraksi air dan fraksi n-heksana menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih rendah daripada ampisilin (>60%) terhadap bakteri *B. subtilis*. Semua sampel tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. aeruginosa* kecuali ampisilin (>60%). Berdasarkan hasil ini, fraksi n-heksana menunjukkan adanya penghambatan bakteri secara maksimal dan memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi dibandingkan fraksi lainnya. Kontrol negatif

(DMSO) tidak memiliki pengaruh pada penghambatan pertumbuhan bakteri. Hal tersebut menunjukkan bahwa DMSO tidak berpengaruh pada pengujian antibakteri. Ekstrak metanol dan fraksi-fraksinya hanya menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap 2 bakteri antara lain *S. aureus* dan *E. coli*.

Tabel 4.6. Nilai IC₅₀ aktivitas antibakteri pada daun *S. polyanthum* Wight terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*

Sampel Uji	Nilai IC ₅₀ terhadap bakteri (µg/mL)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Ekstrak Metanol	23,16	35,01
Fraksi Air	NA*	75,70
Fraksi Etil Asetat	80,82	NA*
Fraksi <i>n</i> -Heksana	49,25	27,54
Ampisilin	37,82	10,28

NA* adalah tidak aktif sebagai antibakteri

Nilai IC₅₀ pada aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol dan fraksi-fraksi daun *S. polyanthum* Wight daun terhadap *S. aureus* dan *E. coli* ditunjukkan pada Tabel. 4.6. Nilai IC₅₀ dari ekstrak metanol terhadap *S. aureus* menunjukkan nilai penghambatan yang baik pada konsentrasi 23,16 µg/mL dibandingkan kontrol positif ampisilin pada konsentrasi 37,82 µg/mL terhadap *S. aureus*. Nilai IC₅₀ ampisilin terhadap *E. coli* menunjukkan nilai penghambatan yang baik pada konsentrasi 10,28 µg/mL dibandingkan ekstrak metanol dan fraksi-fraksi daun *S. polyanthum* Wight. Ekstrak metanol dan fraksi-fraksi daun *S. polyanthum* Wight memiliki penghambatan rendah dan/atau tidak dapat menghambat bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*. Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya potensi besar pada ekstrak metanol dan fraksi-fraksi daun *S. polyanthum* Wight sebagai sumber antibakteri.

Ekstrak *n*-heksana memiliki aktivitas antibakteri tertinggi terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Hal ini dapat dijelaskan bahwa adanya senyawa aktif yang bertanggung jawab sebagai antibakteri dari ekstrak berada dalam fraksi non-polar dalam konsentrasi yang relatif lebih tinggi (Tadeg dkk., 2004). Ekstrak tersebut dapat menghambat bakteri Gram-positif dan Gram-negatif yang diuji secara *in vitro* dan menunjukkan bahwa ekstrak daun *S. polyanthum* Wight dan fraksi-fraksinya memiliki aktivitas antibakteri spektrum luas. Studi penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa adanya potensi antibakteri serupa telah diamati dalam ekstrak kultur *Irpex lacteus* (Rosa dkk., 2003).

Berbagai pelarut yang digunakan memiliki perbedaan kelarutan dengan ekstrak daun sehingga menghasilkan adanya perbedaan kandungan senyawa bioaktif dalam berbagai ekstrak daun *S. polyanthum* Wight. Hal tersebut menunjukkan adanya potensi antibakteri yang berbeda dari penelitian sebelumnya seperti dapat menghambat bakteri *Salmonella thypi* (1-1,25 mm), *Tricophyton mentagrophytes* (0,25-0,41 mm), *B. cereus* (0,31-0,62 mm) (Rosa dkk., 2003), *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *Vibrio cholera* (MIC > 1000 µg/mL), *B. subtilis* (MIC 31,25 µg/mL) (Alwani dkk., 2016), *S. typhimurium* (MIC 31,25 µg/mL) dan *B. subtilis* (MIC 62,5 µg/mL) (Hamad dkk., 2017). Aktivitas antibakteri dari ekstrak tergantung pada konsentrasi/dosis dan jenis bakteri yang digunakan sebagai komponen kimia dalam ekstrak. Semakin tinggi konsentrasi senyawa antibakteri, kandungan senyawa antibakteri akan semakin kuat aktivitas antibakteri (Calvo dkk., 2011).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri pada ampicilin memiliki penghambatan yang lebih besar terhadap bakteri Gram-negatif (*E. coli*) daripada bakteri Gram-positif (*S. aureus*). Umumnya, bakteri Gram positif lebih mudah dihambat dibandingkan dengan bakteri Gram-negatif, bukan sebaliknya. Hal ini disebabkan perbedaan sensitivitas bakteri Gram-positif dan Gram-negatif adalah perbedaan konstitusional morfologis antara mikroorganisme tersebut. Bakteri Gram-negatif memiliki tiga lapisan membran tebal dan ada membran fosfolipid di bagian terluar yang dapat membawa komponen lipo-polisakarida struktural. Hal ini membuat dinding sel kedap bahan kimia antibakteri sehingga senyawa antibakteri tidak dapat masuk dan menembus sel. Dinding sel bakteri

Gram-negatif lebih kompleks daripada dinding sel bakteri Gram-positif. Bakteri Gram-positif cenderung lebih rentan karena mereka memiliki lapisan tunggal peptidoglikan eksternal yang bukan merupakan penghalang permeabilitas yang efektif. Hal ini disebabkan struktur dinding sel bakteri Gram-positif yang lebih sederhana, sehingga lebih mudah bagi senyawa antibakteri untuk memasuki sel dengan menembus dinding sel bakteri (Nostro dkk., 2000).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan kesimpulan bahwa ekstrak metanol dan fraksi-fraksi dari daun *S. polyanthum* Wight berpotensi sebagai antidiabetes (enzim α -glukosidase dan aldosa reduktase), antioksidan (DPPH dan ABTS), serta antibakteri (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*). Fraksi etil asetat memiliki bioaktivitas yang baik pada penghambatan enzim α -glukosidase sebesar 83,73%, enzim aldosa reduktase sebesar 89,92%, penghambatan DPPH sebesar 94,08% dengan IC₅₀ sebesar 21,75 μ g/mL, penghambatan ABTS sebesar 95,12% dengan IC₅₀ sebesar 11,82 μ g/mL namun memiliki nilai penghambatan rendah terhadap bakteri *S. aureus* dan tidak menghambat bakteri *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*. Berdasarkan hasil bioaktivitas tersebut dari fraksi etil asetat dilakukan isolasi senyawa dari fraksi tersebut. Isolasi senyawa menggunakan metode pemisahan dan pemurnian, serta identifikasi struktur senyawa menggunakan analisa ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC dan HMQC. Hasil isolasi senyawa dari fraksi etil asetat didapatkan senyawa E5.C3 (11,1 mg) yang merupakan senyawa etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil) benzoate. Ekstrak metanol, fraksi-fraksi dan senyawa metabolit dalam daun *S. polyanthum* Wight tersebut dapat berpotensi sebagai alternatif pengobatan untuk meningkatkan kesehatan masyarakat.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut pada hasil isolasi senyawa etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil) benzoate perlu dilakukan pengujian bioaktivitas sebagai antioksidan, antidiabetes dan antibakteri. Perlakuan isolasi senyawa lain dari fraksi lain yang aktif perlu diteliti lebih lanjut. Hal tersebut dilakukan untuk mencari senyawa yang berpotensi dan dapat digunakan sebagai obat dengan uji klinik secara *in vivo* untuk mengetahui nilai toksisitas dan memiliki tingkat keamanan yang baik.

”Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Alwani, H., Gigih, M. P. M., Istifah, dan Dwi, H. 2016. Antimicrobial and volatile compounds study of four spices commonly used in Indonesian culinary. *Journal of Food and Pharmaceutical Science*. 4 : 1-5.
- Ameer, O. Z., Salman, I. M., Siddiqui, M. J. A., Yam, M. F., Sriramaneni, R. N., Sadikun, A., Ismail, Z., Shah, A. M., dan Asmawi, M. Z. 2010. Cardiovascular activity of the n-butanol fraction of the methanolextract of *Loranthus ferrugineus* Roxb. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 43 (2) : 186-194.
- Arias, M. E., Gomez, J. D., Cudmani, N. M., Vattuone, M. A., dan Isla, M. I. 2004. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. Ex Hook et Arn. *Life Science*. 75 : 191-202.
- Arintawati, M. 2000. Identifikasi dan karakterisasi komponen aroma daun salam. Tesis. Program Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezzenia, E. C., dan Atangbayila, T. O. 2008. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (3) : 1019-1024.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., dan Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117 : 426–436.
- Bambang, S. dan Eko S. 2005. Stres oksidatif dan peran antioksidan pada diabetes melitus. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 55 (2) : 86-91.
- Bang, T. H., Suhara, H., Doi, K., Ishikawa, H., Fukami, K., Parajuli, G. P., Katakura, Y., Yamashita, S., Watanabe, K., Adhikari, M. K., Manandhar, H.

- K., Kondo, R., dan Shimizu, K. 2014. Wild mushrooms in Nepal: some potential candidates as antioxidant and ACE-inhibition sources. in Hindawi Publishing Corporation, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 195305.
- Bayer. 2011. Precose. Bayer Health Care Pharmaceuticals Incorporation Amerika.
- Berna, E., Rosita, H., Rani, S. dan Permatasari, Y. I. 2015. Antidiabetic activity and phytochemical screening of extracts Indonesian plants by inhibition of α -amylase, α -glucosidase and dipeptidyl peptidase IV. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 18 (6) : 273-278.
- Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A., dan Sroka, Z. 2013. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej Journals*. 67 : 958-963.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., dan Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissens-chafund-Technologie*. 28 : 25-30.
- Chetan, M. D., Azhagarasan, N. S., Miglani, S., Mohammed, H. S., dan Prasad, A. H. 2011. Microbiological evaluation of the effectiveness of commercially available denture cleansing agents. *International Journal of Drug Development and Research*. 3 (3) : 159-172.
- Dewoto, H. R. 2007. Pengembangan obat tradisional Indonesia menjadi fitofarmaka. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 57 (7).
- Dirjen POM, Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. Farmakope Indonesia. Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1083-1084.
- Drianti, A. 2012. Analisis permintaan tanaman obat pada industri obat tradisional di Kalimantan Selatan. *Jurnal Ekonomi Manajemen*. 6 (1).

- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., dan Merillon, J. M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 : 1768-1774.
- Evendi, A. 2017. Uji fitokimia dan antibakteri ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* secara in vitro. *Mahakam Medical Laboratory Technology Journal*. 2 (1) : 1-9.
- Fatmawati, S., Shimizu, K., dan Kondo, R. 2011. Structure–activity relationships of ganoderma acids from *Ganoderma lucidum* as aldose reductase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21 : 7295–7297.
- Fardiaz, S. 1986. Mikrobiologi pangan. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka.
- Farmakope Herbal Indonesia (FHI). 2009. Farmakope Herbal Indonesia Edisi I. Depkes RI, Jakarta.
- Fifendy, M. 2014. Inhibitory power test of medicinal plants extract against bacterial growth methicilin resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceeding of International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Sciences*.
- Hamad, A., Mahardika, M. G. P., Yuliani, I., dan Hartanti, D. 2017. Chemical constituents and antimicrobial activities of essential oils of *Syzygium polyanthum* and *Syzygium aromaticum*. *Rasayan Journal of Chemistry*. 10 (2) : 564-569.
- Har, L. W. dan Ismail, I. S. 2012. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoids of *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. Leaves. *International Journal of Medicinal Aromatic Plants*. 2 (2) : 219-228.

- Hassan, A., Rahman, S., Deeba, F., dan Mahmud, S. 2009. Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3 (1) : 20-23.
- Hidayati, M. D., Ersm, T., Shimizu, K., dan Fatmawati, S. 2017. Antioxidant activity of *Syzygium polynthum* extracts. *Indonesian Journal of Chemistry*. 17 (1) : 49-53.
- Hostettmann, K., Wolfender, J. L., dan Rodriguez, S. 1997. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica*. 185-187.
- Ismail, A., Mohamed, M., Sulaiman, S. A., dan Ahmad, W. A. N. W. 2013. Autonomic nervous system mediate the hypotensive effects of aqueous and residual methanolic extract of *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. var. polyanthum leaves in anaesthetized rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Ismail, H. F., Zanariah, H., Wong, T. S., Nur, S. A., Ain, N. Z., dan Fadzilah, A. A. M. 2017. Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and zebrafish embryo. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 1-14.
- Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., dan Ernst, R. R. 1979. Investigation of exchange processes by two dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Chemical Physics*. 71 : 4546-4553.
- Kato, E., Nakagomi, R., Gunawan-Puteri, M. D. P. T., dan Kawabata, J. 2013. Identification of hydroxychavicol and its dimers, the lipase inhibitors contained in the Indonesian spice, *Eugenia polyantha*. *Food Chemistry*. 136 (3-4) : 1239-1242.
- Katzung, B. G., Masters, S. B., dan Trevor, A.J. 2009. Basic and clinical pharmacology, 8th Edition. The McGraw-Hill. New York.

- Keeler dan James. 2010. Understanding NMR Spectroscopy (2nd ed.). Wiley : 184-187.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI). 2014. Pusat data dan Informasi kementerian kesehatan RI (Infodatin) : 1-7.
- Khan, A., Safdar, M., Ali Khan, M. M., Khattak, K. N., dan Anderson, R. A. 2003. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 26 : 3215-3218.
- Kusuma, I. W., Kuspradini, H., Arung, E. T., Aryani, F., Min, Y., Kim, J., dan Kim, Y. 2011. Biological activity and phytochemical analysis of three Indonesian medicinal plants, *Murraya koenigii*, *Syzygium polyanthum* and *Zingiber purpurea*. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. 4 (1) : 75-79.
- Lelono, R. A. A., Tachibana, S., dan Itoh, K. 2009. *In vitro* antioxidative activities and polyphenol content of *Eugenia polyantha* wight grown in Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12 : 1564-1570.
- Liliwirianis, N., Musa, N. L. W., Zain, W. Z. W. M., Kassim, J., dan Karim, S. A. 2011. Preliminary studies on phytochemical screening of ulam and fruit from Malaysia. *E-Journal of Chemistry*. 8 (S1).
- Logendra, S., Ribnicky, D. M., Yang, H., Poulev, A., Ma, J., Kennelly, E. J., dan Raskin, I. 2006. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracunculoides*. *Phytochemistry*. 67 : 1539-1546.
- Mahon, C. R. dan Manuselis, J. R. 1995. Textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia USA: WB Saunders Company.
- Majors, R. E. 1999. An overview of sample preparation methods for solids. *LC-GC Europe*. 17 (6) : 8-13.

- Maritim, A. C., Sanders, R. A., dan Watkins. J. B. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidant. *Journal Biochemical and Molecular Toxicology*. 17 (1) : 24-38.
- Markham. 1988. Cara identifikasi flavonoid, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. 1-20. Bandung : Penerbit ITB.
- Meyer, F. R. 2004. Practical High-Performance Liquid Chromatography, 4th Ed., John Wiley & Sons, New York.
- Miranda, R. P. 1997. Methyl 4-Hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl) benzoate, Major Insecticidal Principle from *Piper guianacastensis*. *Journal of Natuural Product*. 60 : 282-284.
- Morin, R. B. dan Gorman, M. 1982. Kimia dan biologi antibiotik b-laktam. Diterjemahkan oleh Dra. Sri Mulyani, Apt, Su. New York : Academic Press. 3 : 418.
- Nishimura, C.Y. 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: A potential targets for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological Reviews*. 50 (1) : 21-33.
- Noveriza R., dan Miftakhurohmah. 2010. Efektivitas ekstrak metanol daun salam (*Eugenia polyantha*) dan daun jeruk purut (*Cytru histrix*) sebagai antijamur pada pertumbuhan *Fusarium oxysporum*. *Jurnal Littri*. 16 (1) : 6-11.
- Nurhalimah, H., Wijayanti, N., dan Widyaningsih, T. D. 2015. Efek antidiare ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap mecit jantan yang diinduksi bakteri *Salmonella thypimurium*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3 (3) : 1083-1094.
- Othman, A., Mukhtar, N. J., Ismail, N. S., dan Chang, S. K. 2014. Phenolics, flavonoids content and antioxidant activities of 4 Malaysian herbal plants. *International Food Research Journal*. 21 (2) : 759-766.

- Patel, D., Prasad, S., Kumar, R., dan Hemalatha, S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4 : 320–330.
- Patil, P., Mandal, S., Kumar, S., dan Anand, S. 2015. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*. 54 (6) : 1-18.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C. S. 1988. Dasar-dasar mikrobiologi. Jakarta: UI Press.
- Pellegrini, N., Re, R., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., dan Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (9-10) : 1231-1237.
- Perumal, S., Mahmud, R., Piaru, S. P., Cai, L. W., dan Ramanathan, S. 2012. Potential antiradical activity and cytotoxicity assessment of *Ziziphus mauritiana* and *Syzygium polyanthum*. *International Journal of Pharmacology*. 8 (6) : 535-541.
- Poole, S. K., Dean, T. A., Oudsema, J. W., dan Poole, C. F., 1990. Sample preparation for chromatographic separations: an overview. *Analytica Chimica Acta*. 236 (1) : 3-42.
- Pourmorad, F., Hosseini-mehr, S. J., dan Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plant. *African Journal of Biotechnology*. 5 (11) : 1142-1145.
- Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T., dan Bennet, B. C. 2008. Effect of extract from Italian medicinal plant on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Ethnopharmacology*. 118 (3) : 418-428.

- Ramachandran, A., Das, A. K., Joshi, S. R., Yajnik, C. S., Shah, S., dan Prasanna Kumar, K. M. 2010. Current Status of Diabetes in India and Need for Novel Therapeutic Agents. Supplement to JAPI. 58.
- Richard, W. G., dan Sue, M. K. 2015. Trends in the evidence level for the American Diabetes Associations “Standards of medical care in diabetes” from 2005 to 2014. *Diabetes Care*. 38 (1) : 6-8.
- Rizki, M. I. dan Hariandja, E. M. 2015. Review article : Aktivitas farmakologis, senyawa aktif dan mekanisme kerja daun salam (*Syzygium polyanthum*). *Prosiding Seminar Nasional dan Workshop “Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik 5”*.
- Rubalya, V. S. dan Neelamegam, P. 2015. Selective ABTS and DPPH radical scavenging activity of peroxide from vegetable oils. *International Food Research Journal*. 22 (1) : 289-294.
- Sastrohamdjojo, H. 2002. Kromatografi. Yogyakarta : Liberty.
- Schraml, J. dan Bellama, J. M. 1988. Two-Dimensional NMR Spectroscopy. New York: Wiley. 28-65.
- Sembiring, B. S., Winart, C., dan Baringbing, B. 2003. Identifikasi komponen kimia minyak daun salam (*Eugenia polyantha*) dari Sukabumi dan Bogor. Buletin TRO. 14 (2) : 10-16.
- Shalaby, E. A. dan Sanaa, M. M. S. 2013. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. 42 (5) : 556-564.
- Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J., dan Zito, S. W. 2008. Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn) skeels seed kernel in vitro an in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Journal Carbohydrate Research*. 343 (7) : 1278-1281.

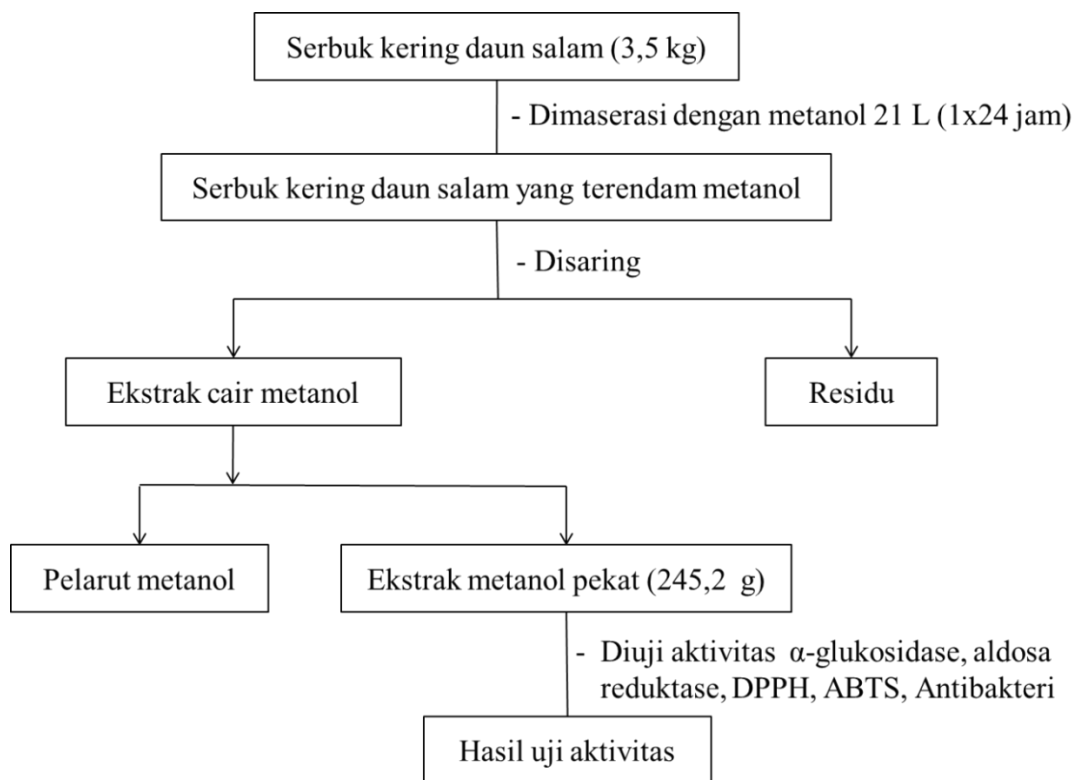
- Sri, W. dan I Wayan, W. 2017. Hypoglycemic and antioxidant effects of *Syzygium polyanthum* leaves extract on alloxan induced hyperglycemic Wistar Rats. *Bali Medical Journal*. 3 (3) : 113-116.
- Sudirman, A. T. 2014. Uji efektivitas ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Sulistyo. 1971. Farmakologi dan terapi. Yogyakarta: EKG.
- Sumono, A. dan Wulan, A. 2009. Kemampuan air rebusan daun salam (*Eugenia polyantha* W.) dalam menurunkan jumlah koloni bakteri *Spectroccocus sp.* *Majalah Farmasi Indonesia*. 20 (3) : 112-117.
- Sutrisna, E. M., Ika, S., Rima, M., dan Suprpto. 2016. Antioxidant and antidiabetic activity of 70% ethanolic extract of *Syzygium polyanthum* (Wight) leaf from Indonesia. *International Journal of Research in Ayurveda Pharmacy*. 7 (2) : 214-216.
- Venkataraman, K. 1972. Wood Phenolic in the Chemotaxonomy of the *Moraceae*, *Phytochemistry*. 11 : 1571-1586.
- Wasito, H. 2011. Obat Tradisional Kekayaan Indonesia. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Wattimena, G. A. 1987. Diktat zat Pengatur Tumbuh Tanaman. Bogor : Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PAU Bioteknologi IPB-Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Widharna, R. M., Ferawati, Hendriati, L., Surjadhana, A., Jonosewo, A., dan Widjajakusuma, E. C. 2010. Antidiabetic properties of *Andrographis paniculata* and *Eugenia polyantha* Wight leaves in wistar rats by oral glucose tolerance test. *The Journal of Indonesian Medicinal Plants*. 3 (2) : 88-93.

- Widharna, R. M., Ferawati, Wahyu, D. T., Lucia, H., Iwan, S. H., dan Elisabeth, C. W. 2015. Antidiabetic effect of the aqueous extract mixture of *Andrographis paniculata* and *Syzygium polyanthum* leaf. *European Journal of Medicinal Plants*. 6 (2) : 82-91.
- Widowati, L. dan Sa'roni. B. D. 1997. Tanaman obat untuk diabetes melitus, Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, DEPKES RI, Jakarta.
- Widowati, W. 2008. Potensi antioksidan sebagai antidiabetes. *Jurnal Kedokteran Maranatha*. 7 (2) : 193-202.
- Widyawati, T., Purnawan, W. W., Atangwho, I. J., Yusoff, N. A., Ahmad, M., dan Asmawi, M. A. 2015. Antidiabetic activity of *Syzygium polyanthum* (wight) leaf extract, the most commonly used herb among diabetic patients in Medan, North Sumatera, Indonesia. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6 (4) : 1698-1704.
- Wientarsih, I., Iskandar, M., dan Saputra, G. H. 2007. The effect of bay leaves infusum (*Syzygium polyanthum* Wight) on anti inflammation in white rat sprague-dawley. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropis*. (Beiheft 90) : 102-109.
- World Health Organization. 1979. The selection of essential drugs. Second report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series. 641 : 1-44.
- World Health Organization. 2016. Global report on diabetes. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 1-88.

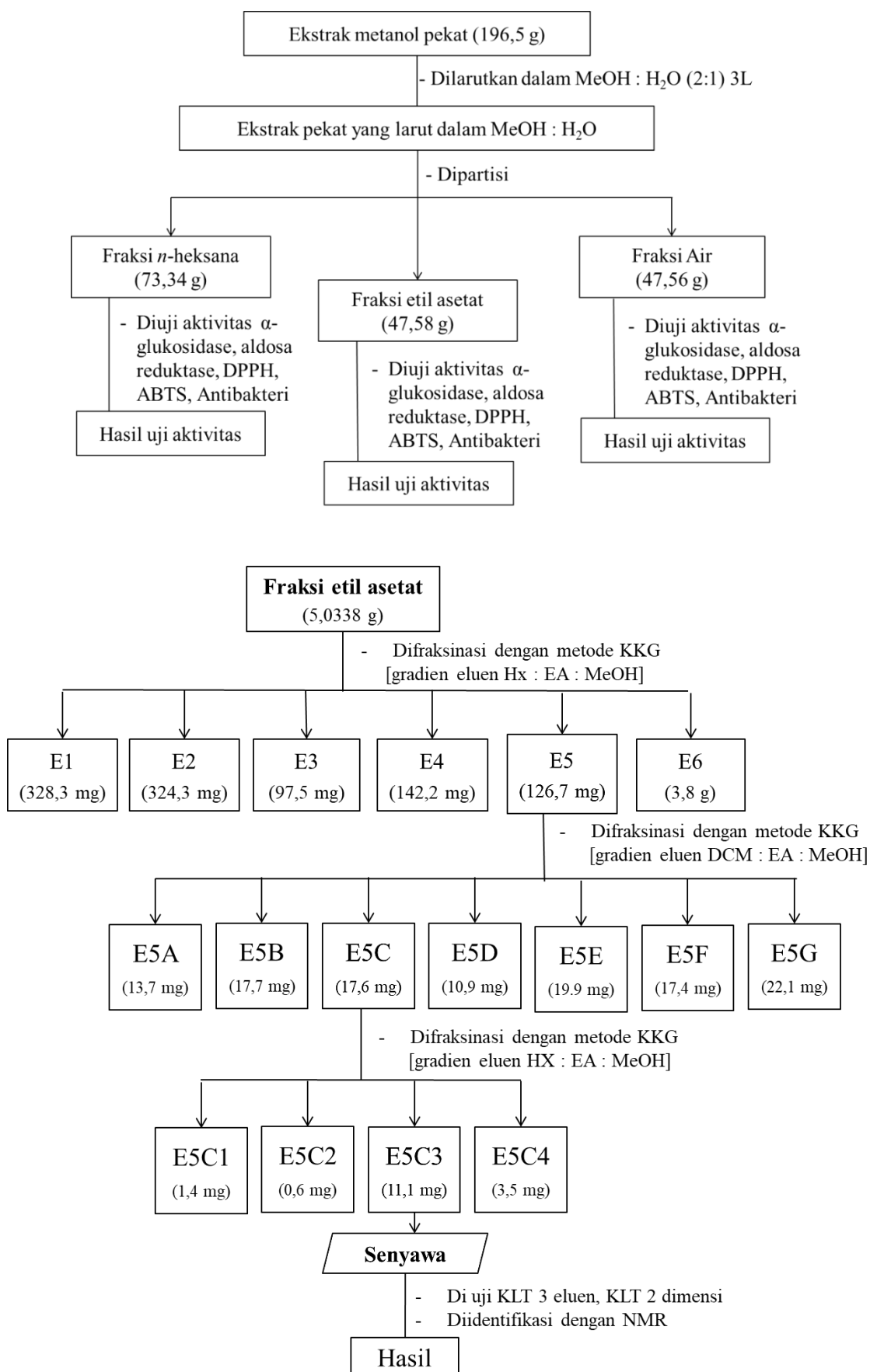
LAMPIRAN

LAMPIRAN A : SKEMA KERJA

1. Ekstraksi Daun *S. polyanthum* Wight

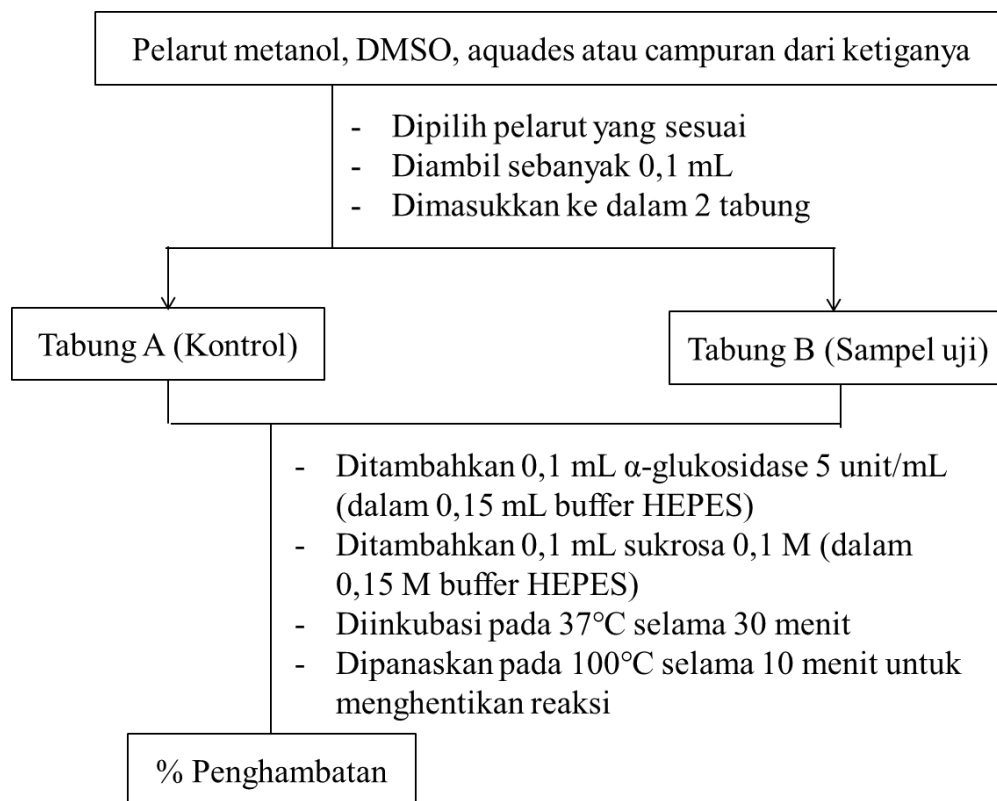


2. Isolasi Senyawa dari Daun *S. polyanthum* Wight

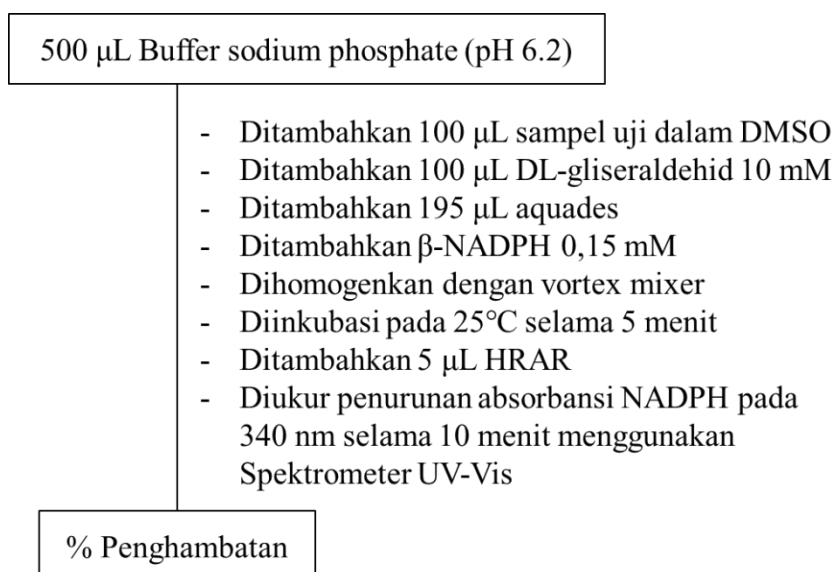


3. Uji Bioaktivitas Senyawa dari Daun *S. polyanthum* Wight

a) Uji Aktivitas Inhibitor α -glukosidase



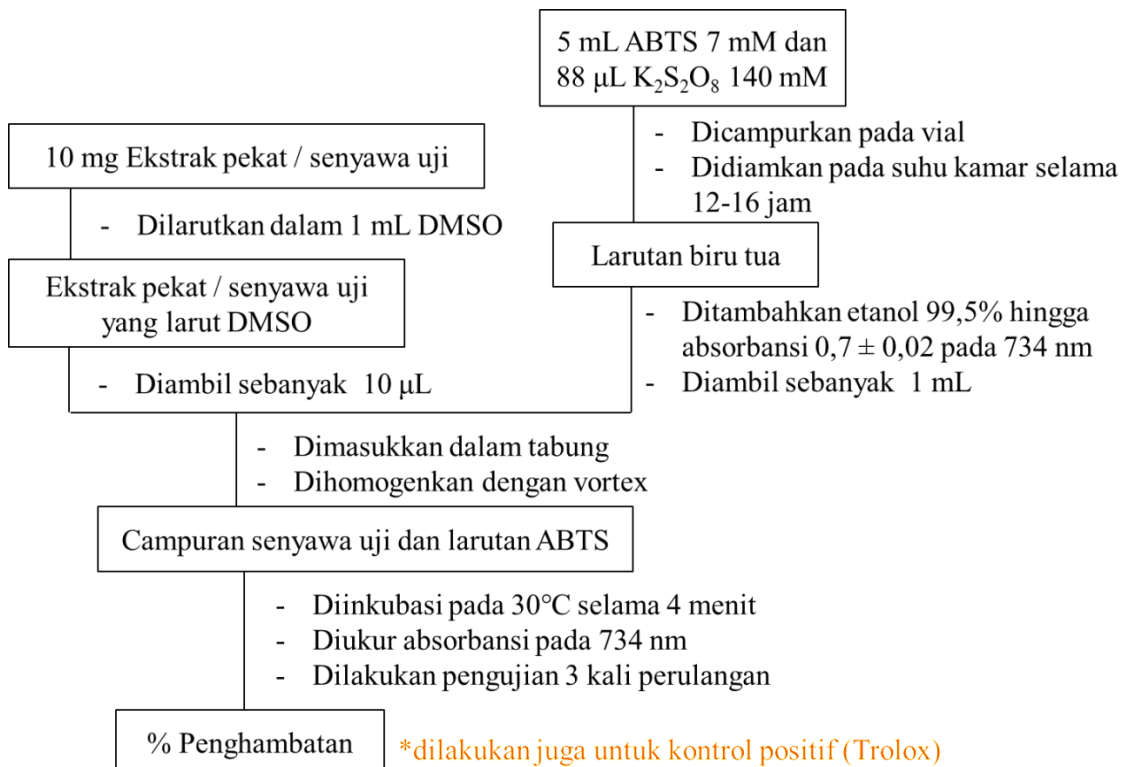
b) Uji Aktivitas Inhibitor Aldosa Reduktase



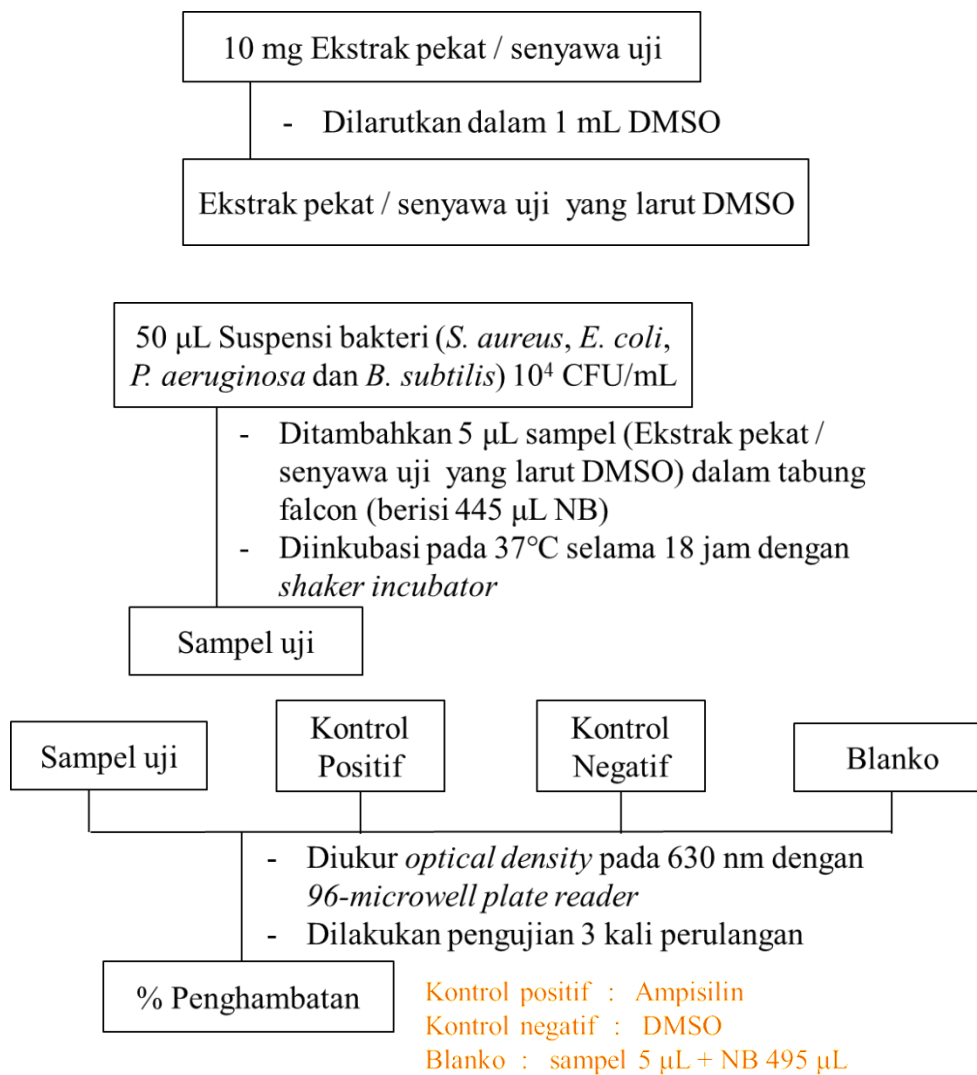
c) Uji Aktivitas Antioksidan DPPH



d) Uji Aktivitas Antioksidan ABTS

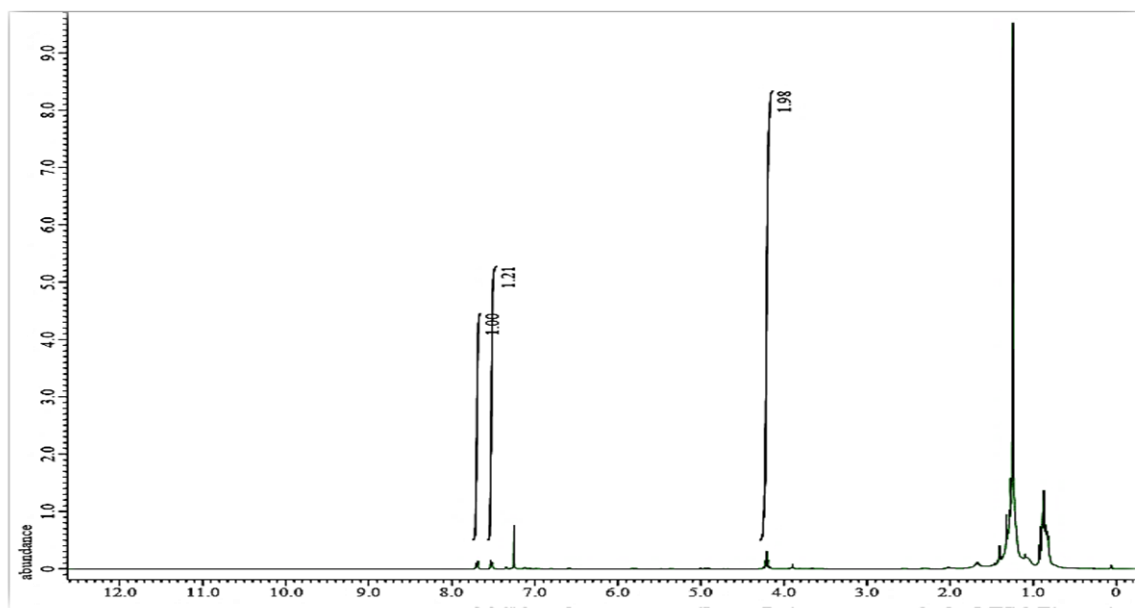


e) Uji Aktivitas Antibakteri

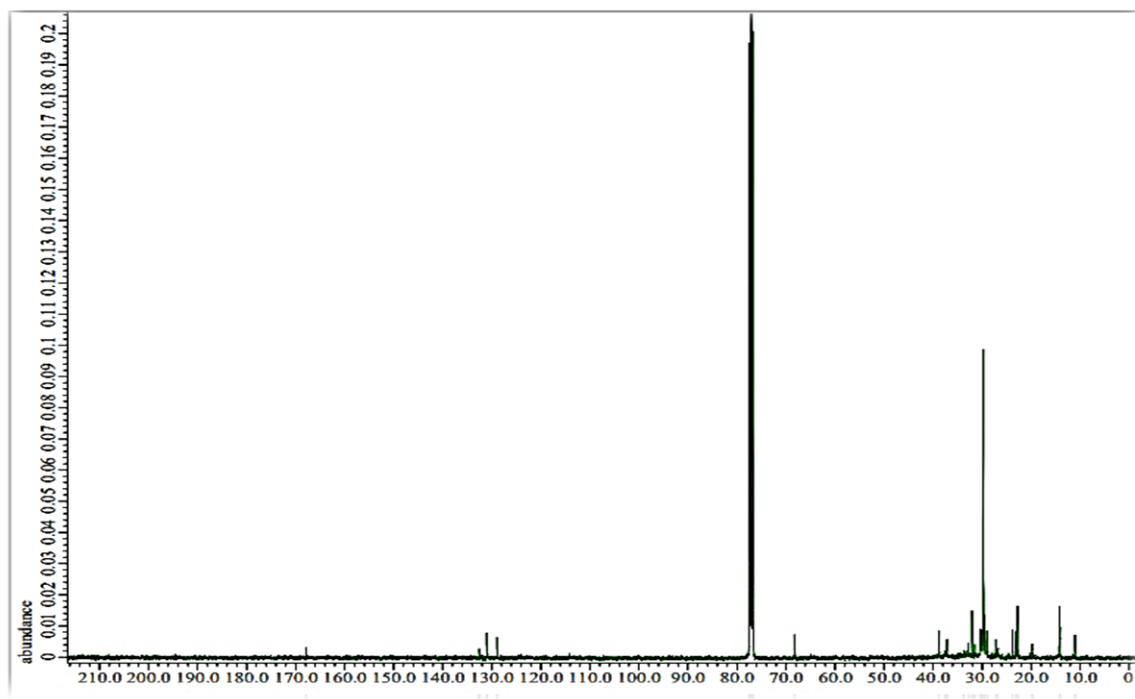


LAMPIRAN B : SPEKTRA NMR

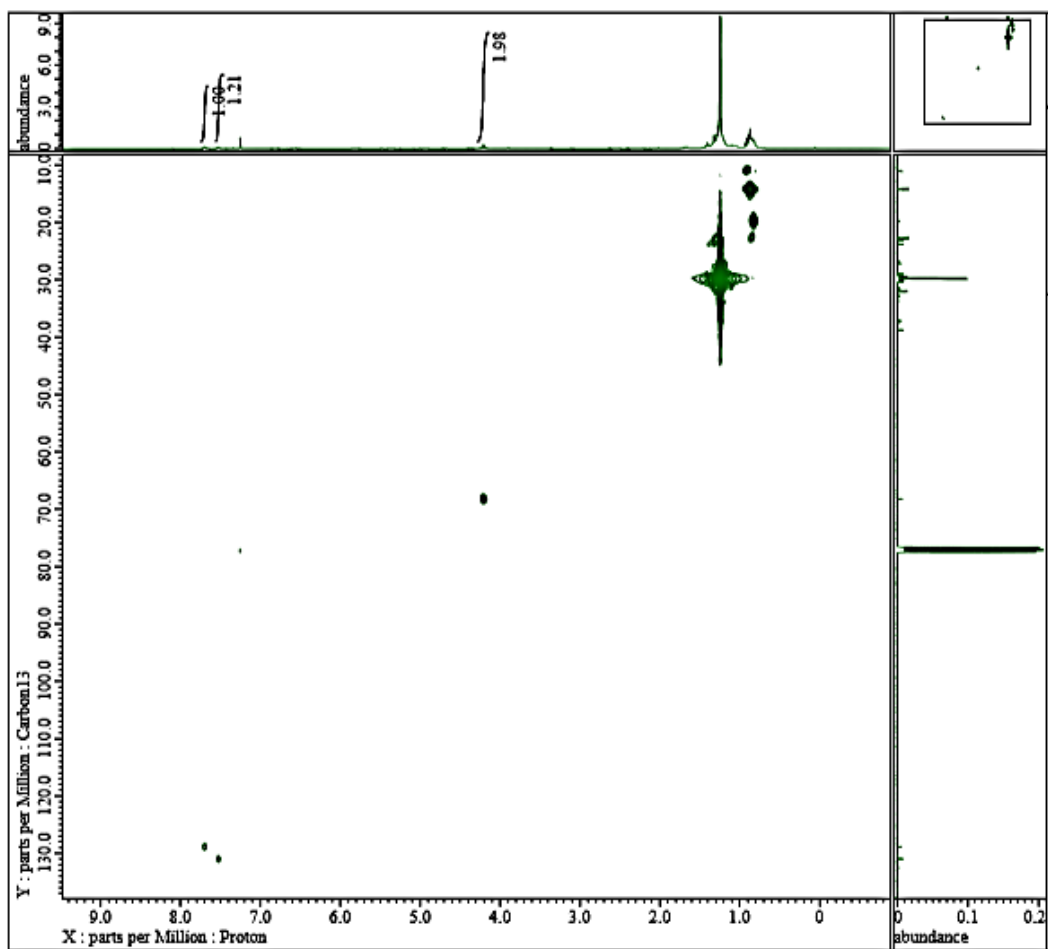
1. Spektra ^1H -NMR senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat)



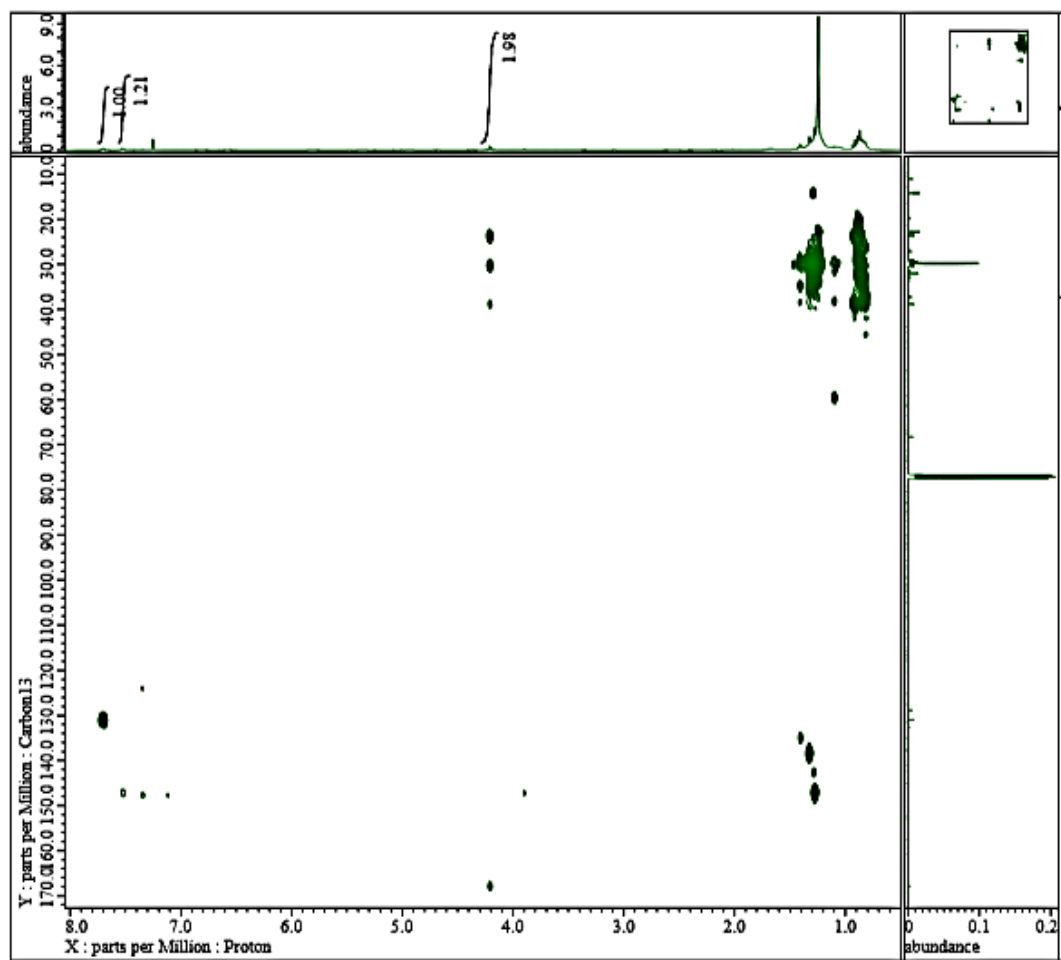
2. Spektra ^{13}C -NMR senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat)



3. Spektra HMQC senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat)

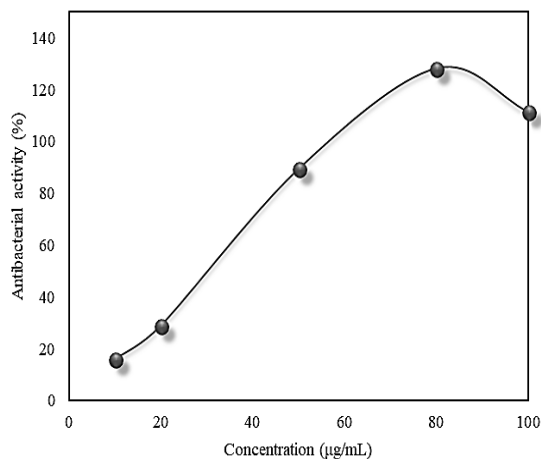


4. Spektra HMBC senyawa E5.C3 (etil 4-hidroksi-3(3'-metil-2'-butenil)benzoat)



LAMPIRAN C : PERHITUNGAN

Perhitungan nilai IC₅₀ pada ekstrak metanol terhadap *S. aureus*



Persamaan garis linear pada grafik diatas adalah $y = 49,863\ln(x) - 106,67$ dengan $R^2 = 0,9346$, maka didapatkan nilai IC₅₀ sebesar :

$$y = 49,863\ln(x) - 106,67$$

$$50 = 49,863\ln(x) - 106,67$$

$$50 + 106,67 = 49,863\ln(x)$$

$$156,67 = 49,863\ln(x)$$

$$\ln(x) = 156,67 / 49,863$$

$$\ln(x) = 3,1420091$$

$$x = 23,16$$

Dengan rumus yang sama, maka didapatkan data nilai IC₅₀ pada ekstrak metanol dan fraksi-fraksi dari *S. polyanthum* Wight adalah sebagai berikut:

Sampel Uji	Nilai IC ₅₀ terhadap bakteri (µg/mL)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Ekstrak Metanol	23.16	35.01
Fraksi Air	NA*	75.70
Fraksi Etil Asetat	80.82	NA*
Fraksi <i>n</i> -Heksana	49.25	27.54
Ampisilin	37.82	10.28

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Sidoarjo, 16 Februari 1994 dan merupakan anak kedua dari dua bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal yaitu: • SD Laboratorium UNESA Surabaya • SMP Negeri 6 Surabaya • SMA Negeri 4 Surabaya. Penulis diterima di Jurusan Kimia FMIPA-ITS Surabaya melalui jalur SNMPTN undangan dan terdaftar dengan NRP 1412100003. Setelah mendapatkan gelar sarjananya, penulis melanjutkan studi S2 di Departemen Kimia

Fakultas Ilmu Alam ITS dengan beasiswa fresh graduate. Penulis tercatat sebagai mahasiswa S2 Departemen Kimia – FIA, angkatan 2016 dengan NRP 01211650010020. Selama masa studi, penulis pernah menjadi pemakalah dalam konferensi internasional ISOC 2016 dan ISST 2017 di Surabaya. Pada masa akhir studi, penulis melakukan penelitian mengenai metabolit sekunder, antidiabetes, antioksidan dan antibakteri dari *Syzygium polyanthum* Wight. Penelitian yang dilakukan penulis dibawah bimbingan Ibu Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D. Email : nurina1602@gmail.com Telp. : 0838-4967-8290.